

RECHERCHES SUR LE MÉCANISME DE L'ACTION ANTIBACTÉRIENNE DE LA BACITRACINE

THÈSE

présentée

A LA FACULTE DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'état)

par

Francine SÉBASTIEN

Pharmacien

Diplômée de Bactériologie, Sérologie, Parasitologie et Hématologie,

Licenciée ès-Sciences,

Maître-Assistante à la Faculté de Paris

Soutenue le 21 Décembre 1970

Jury		Mademoiselle S. LAMBIN, Président	}	Examineurs
		Monsieur A. GERMAN		
		Monsieur A. DESVIGNES		



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551621_0037

RECHERCHES SUR LE MÉCANISME DE L'ACTION ANTIBACTÉRIENNE DE LA BACITRACINE

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(Diplôme d'état)

par

Francine SÉBASTIEN

Pharmacien

Diplômée de Bactériologie, Sérologie, Parasitologie et Hématologie,

Licenciée ès-Sciences,

Maître-Assistante à la Faculté de Paris

Soutenue le 21 Décembre 1970

Jury		Mademoiselle S. LAMBIN, Président	}	Examineurs
		Monsieur A. GERMAN		
		Monsieur A. DESVIGNES		

RECHERCHES SUR LE MÉCANISME DE L'ACTION ANTIBACTÉRIENNE DE LA BACITRACINE

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

Pour l'obtention du Degré de Docteur en Pharmacie

Par M. LÉON LÉON

Docteur en Pharmacie



FRANÇOIS SEBASTIEN

Président de la Faculté de Pharmacie, M. LÉON LÉON, Docteur en Pharmacie, a été nommé pour l'année 1917-1918, à la Faculté de Pharmacie de Paris, pour l'obtention du Degré de Docteur en Pharmacie.

Le 17 Mars 1918

Le Docteur en Pharmacie, M. LÉON LÉON, a été nommé pour l'année 1917-1918, à la Faculté de Pharmacie de Paris, pour l'obtention du Degré de Docteur en Pharmacie.

Le 17 Mars 1918

A LA MEMOIRE DE MES PARENTS

A MADEMOISELLE LE PROFESSEUR S. LAMBIN,

Professeur de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Paris,
qui m'a accueillie avec grande bienveillance dans son
laboratoire. Grâce à ses conseils et à ses encouragements,
ce travail a pu être réalisé. Elle me fait l'honneur de
présider le jury de cette thèse.

En témoignage de ma très respectueuse reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR A. GERMAN,

Professeur de Virologie à la Faculté de Pharmacie de Paris

A MONSIEUR LE PROFESSEUR A. DESVIGNES,

Professeur de Cryptogamie à la Faculté de Pharmacie de Paris,
qui m'ont dispensé leur enseignement et qui ont accepté de
juger ce travail.

En témoignage de ma dévouée gratitude.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J.A. THOMAS,

Professeur de Biologie Cellulaire à la Faculté des Sciences de Paris,
dont j'ai pu suivre l'enseignement et qui m'a prodigué
directives de recherche et conseils pour les mener à bien.

Avec l'assurance de mes sincères remerciements.

A mon oncle, MONSIEUR JACQUES MARCILHACY,

qui m'a si largement ouvert les portes de la Société Industrielle
pour la Fabrication des Antibiotiques.

Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse affection.

A MONSIEUR J. PHILIPPE,

qui m'a incitée à entreprendre ce travail et m'a fait profiter de
sa grande expérience.

Qu'il soit assuré de ma vive reconnaissance.

A TOUS MES AMIS DU LABORATOIRE, enseignants et techniciens.

Qu'ils sachent mon profond attachement, et qu'ils soient vivement
remerciés, car ce travail est un peu l'oeuvre de chacun.

Que Mademoiselle Jacqueline BERNARD, en particulier, témoin
quotidien de mes espoirs et de mes découragements, qui m'a permis,
par ses critiques et ses suggestions, de le mener à terme,
trouve ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de ma
grande amitié.

PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

M. QUEVAUVILLER A.	Doyen, Président du Conseil transitoire de gestion
M. GUIGNARD J-L.	Assesseur
M. RODINEAU L.	Secrétaire Général
Mme FERRARI S.	Attaché principal d'Administration Universitaire
	Adjointe au Secrétaire Général
M. BRENN A.	Attaché Principal d'Intendance Universitaire
M. JEANDEL L.	Attaché d'Administration Universitaire
M. JACOB	Attaché d'Administration Universitaire
Mlle FRIZOL E.	Attaché d'Administration Universitaire

DOYENS HONORAIRES

M. VALETTE Guillaume
M. MALANGEAU Pierre

PROFESSEURS HONORAIRES

M. LAUNOY L.
M. FLBURY P.
M. PICON M.

PROFESSEURS

M. JANOT M-M.	Pharmacie Galénique
M. VALETTE G.	Pharmacodynamie
M. PARIS R.	Matière Médicale
M. GUILLOT M.	Physique
M. GAUTIER J-A.	Chimie organique
Mlle LAMBIN S.	Microbiologie
M. RADUL Y.	Physiologie
M. COURTOIS J.	Chimie biologique
M. DOMANGE L.	Chimie générale et minérale
M. TRUHAUT R.	Toxicologie et hygiène industrielle
M. MORETTE A.	Hydrologie
M. CAVIER R.	Parasitologie
M. QUEVAUVILLER A.	Hygiène et Education sanitaire
M. MOREAU R.	Pharmacie chimique
M. GERMAN A.	Microbiologie
M. PIETTE M.	Hématologie
M. MALANGEAU P.	Chimie analytique
M. GIRARD M.	Biochimie appliquée

PROFESSEURS (suite)

M. DILLEMANN G.	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie
M. DEYSSON G.	Botanique
M. FLAHAUT J.	Minéralogie
M. RENAULT J.	Chimie organique
M. LE HIR A.	Pharmacie galénique
M. BOUDENE C.	Toxicologie et hygiène industrielle
M. LARUELLE P.	Physique
M. ROSSIGNOL P.	Pharmacodynamie
M. MANGEOT A.	Pharmacie galénique industrielle
M. DELAVEAU P.	Séméiologie et Pathologie générale
M. COHEN Y.	Pharmacodynamie
M. RENAULT H.	Physique
M. BOURDON R.	Chimie analytique
M. REYNAUD P.	Pharmacie chimique
M. LE MOAN R.	Toxicologie
M. POISSON	Pharmacie galénique
M. MICHEL R.	Endocrinologie
M. LECLERC M.	Hématologie
M. PERCHERON F.	Chimie biologique
M. SAVEL J.	Biologie animale
M. DESVIGNES A.	Cryptogamie et technique bactériologique
M. MIOCQUE M.	Chimie organique

MAITRES DE CONFERENCES

M. PAOLETTI C.	Toxicologie
M. BORY J.	Microbiologie
M. GUIGNARD J-L.	Botanique générale
M. GOUNELLE J-C.	Physiologie
M. BINET P.	Biologie animale
M. COMBET-FARNOUX C. §	Chimie organique
M. PLAT M.	Chimie analytique
Mme PLAT M.	Législation et déontologie pharmaceutique
M. DELACOUX E.	Pharmacie chimique
M. CAVE A.	Matière médicale
M. PUISIEUX F.	Pharmacie galénique
M. DUCHON d'ENGENIERES	Chimie organique
M. ADOLPHE C.	Physique
M. GUERNET M.	Chimie analytique
M. DIDRY J.	Mathématiques appliquées aux Sciences expérimentales
M. KHODADAD P.	Chimie minérale
M. PERLES R.	Chimie biologique
M. LEMONNIER A.	Biochimie appliquée
M. YONGER J.	Chimie analytique
M. HAMON M.	Chimie analytique
M. MESTRE J.	Botanique

MAITRES DE CONFERENCES (suite)

M. AGNERAY J.	Biologie
M. DREUX C.	Biochimie appliquée
M. RIVET J.	Chimie générale et minérale
M. ETIENNE J.	Mathématiques
M. HAZEBROUCQ G.	Physique
M. ROUSSELET F.	Biochimie appliquée
M. BOURRINET P.	Hygiène
M. SOULEAU C.	Chimie générale et minérale
Mme HUBERT J.	Microbiologie
Mle BOURNIQUE C.	Botanique

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

M. GESTEAU P.
M. GUERIN H.
Mme HARISPE M.
Mle LONGUEVALLE S.
M. HARISPE

MAITRES-ASSISTANTS ET CHEFS DE TRAVAUX

M. ANDRE Guy	TP Pharmacie galénique 2-3e A.
M. ADAM Yves	TP Pharmacie chimique 5e A.
M. AYMARD Pierre	ED Physiologie-histologie
Mle BARNIER S.	Mathématiques
Mle BENOIS Martine	TP Botanique 2e A.
Mle BERNARD Jacqueline	TP Bactériologie 5e A. Industrie
M. BESANCON Pierre	Mathématiques
Mme BLANC Jeanine	ED Chimie organique 1-2e A.
Mme BONALY J.	ED Botanique 1e A.
Mme BOSIO Anne-Marie	TP Chimie qualitative
M. BOURLIOUX Pierre	CES Bactériologie
M. CAILLARD Claude	TP Pharmacodynamie 4-5e A.
M. CANAL Jacques	ED et TP Biochimie appliquée 5e A (Biol, offic)
M. CARRE Daniel	Mathématiques
Mle CARRERE Clotilde	TP Microbiologie 4e A.
Mme CENAC Jacqueline	C.E.S. Parasitologie
Mme CHARDENOT P.	Chimie Biologique 3-4e A.
Mme CHARPENTIER Madeleine	ED Chimie générale et minérale 1e A.
M. CHERON Jean-Marie	TP Chimie biologique 3-4e A.
Mle CLAIR Geneviève	ED Matière médicale 3-5e A.
M. DAGRON Christian	ED Chimie générale et minérale 2e A.
M. DAVY Jean	CES Biochimie
M. DEBRAY M.	Mathématiques
Mle DECAUDIN Marie-Thérèse	TP Parasitologie 4e A.
M. DELATTRE Jacques	CES Electrochimie et TP 5e A. Biologie
M. DELCOURT Alain	ED Botanique 2e A.
M. DOUSSIN Alexandre	TP Chimie analytique 5e A.

Mlle DUCHENE Dominique
 Mlle DUMANT Geneviève
 Mme DUPONT Charlotte
 M. ETIENNE Guy
 Mme FAURE Liliane
 Mlle FLEURY Solange
 Mlle FOGLIETTI M-Josée
 M. GAIRARD Alexis
 M. GAYRAL Philippe
 Mme BOY Françoise
 M. GIRARDEAU J-F.
 M. GOBERT Jean
 Mlle GOURSAT Marie-Josée
 M. GROSSIORD Jean-Louis
 Mlle GUILLOUX Edith
 M. HENRY Jacques
 Mme JULIEN Maud
 M. JULIEN René
 Mlle JUND Yvonne
 M. LALEGERIE Pierre
 M. LAROCHE Jacques
 Mme LEDUC Yvette
 Mme LEGER Nicole
 M. LELUC Robert
 M. LEMAY René
 Mme LE QUANG THUAN
 M. LEVILLAIN Pierre
 Mme LEVY Françoise
 M. LIKFORMAN Joseph
 Mlle LONGEVIALLE M.
 M. MAHUZIER Georges
 M. MANDEREAU Jean
 M. MANET Léon
 M. MARTIN-FRERE
 M. MAUGUEN Yves
 Mme MAYRARGUE Joëlle
 Mlle MICHELET Annick
 M. MOULIN Pierre
 Mme MOURY Jacqueline
 Mme NOTTEGHEM M-J.
 M. NGUYENH Phu Lich
 Mme PANOUSE Jacqueline
 Mme PAOLAGGI Françoise
 M. PESTIS Jean
 Mme PIETTE Colette
 M. POUILLAIN Pierre
 M. POUSSET Jean-Louis
 M. QUENEZ Pierre

CES Pharmacie galénique industrielle
 CES Analyse physicochimique des médicaments
 CES Pharmacodynamie
 TP Pharmacie galénique 2-3e A.
 ED Chimie organique 1-2e A.
 ED Chimie analytique quantitative
 TP Chimie biologique 3-4e A.
 CES contrôle des médicaments (biologie)
 TP Zoologie 1e A.
 Mathématiques
 TP Chimie organique 5eA (synthèse organique)
 TP ZOOLOGIE 1e A.
 ED Botanique 1e A.
 TP Physique 1e A.
 TP Chimie biologique 3-4e A.
 Essais Médicaments chimiques et galéniques
 ED Physique 2e A.
 ED Chimie minérale 1e A.
 CES Microbiologie et contrôle des médicaments
 CES Biologie
 TP Secourisme et hygiène 5e A.
 TP Chimie analytique qualitative
 Parasitologie 5e A.
 CES Bactériologie
 CES Législation
 TP Chimie analytique qualitative
 ED Chimie analytique qualitative
 ED Botanique 2e A.
 ED Physique 1e A.
 ED Botanique 1e A.
 TP Chimie analytique quantitative
 CES Pharmacotechnie chimique
 CES Biochimie
 TP Chimie générale et minérale 1e A.
 Mathématiques
 ED Chimie organique 1-2e A.
 ED Chimie générale et minérale 2e A.
 TP Physique 1e A.
 TP Zoologie 1e A.
 ED Parasitologie 4e A.
 CES Toxicologie
 CES Immunologie - Virologie
 CES Electrochimie et TP 5e A. Biologie
 TP Anatomie, Physiologie humaine
 CES Hématologie 5e A. Biologie
 CES Hématologie 5e A. Biologie
 TP Chimie extractive 5eA.
 TP Chimie générale et minérale 1e A.

Mme RABIAN	Odile	ED Chimie analytique et qualitative
M. RABARON	Alain	CES Pharmatotechnie galénique
Mme ROBERT	Monique	CES Immunologie - Microbiologie
M. RODIER	Noël	ED Physique 2e A.
Mlle ROLLEN	Alice	TP Botanique 1e A.
Mlle ROUSSELET	Renée	Essais médicaments végétaux
Mme RUDLER	Michèle	ED Chimie organique 1-2e A.
Mme SALES	Nicole	TP Physiologie, Histologie
Mlle SEBASTIEN	Francine	TP Microbiologie 5e A. (Biologie-Officine)
M. SCHUSTER	Jean	Essais des médicaments chimiques et galéniques
Mlle SORIA	Claudine	Biologie-officine 5e A.
Mme SEILLER	Monique	TP Pharmacie galénique industrielle
Mlle STRUPLER	Nicole	ED Chimie générale et minérale 1e A.
M. TOUBOUL	Jean-Pierre	TP Chimie analytique 5e A.
M. TRIEU	Thuong Cong	TP Chimie analytique quantitative
Mlle TROUPEL	Splange	TP Chimie analytique quantitative
Mme VAN AMERONGEN	G.	ED Chimie analytique quantitative
M. VAYSSIERE	Jean-Michel	ED Chimie organique 1-2e A.
M. VILLERS	Jacques	TP Physique 2e A.
Mme WELBY	Josette	TP Pharmacie galénique

BIBLIOTHEQUE

Mlle RUYSSSEN	Y.	Conservateur en chef
Mme DESGRIPPES	A.	Conservateur
Mme COULET	M-A.	Conservateur
Mlle LANGLOIS	C.	Conservateur

INTRODUCTION

=====

La bacitracine, parmi la longue liste des antibiotiques utilisés à l'heure actuelle, figure parmi les plus anciens, puisque sa découverte par B.A.JOHNSON et F.L.MELENEY date de 1943. Mais ce n'est qu'en 1948 que ces auteurs (7) en donnèrent réellement une première description complète.

La structure de cet antibiotique n'est pas encore totalement éclaircie : il s'agit, en fait, d'un mélange (bacitracine A,B,C,D, E et F) de composés de structure peptidique, de poids moléculaire environ 1500, certains enchaînements d'acides aminés formant des cycles (74).

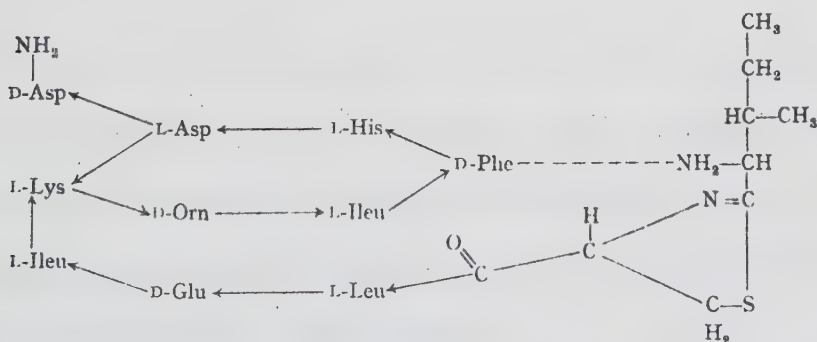


Fig.1. Structure probable de la bacitracine A, selon REGNA (1959)

La bacitracine A est la plus abondante et la plus active à l'égard des microorganismes, alors que son produit d'oxydation, la bacitracine F est inactive (46), (54).

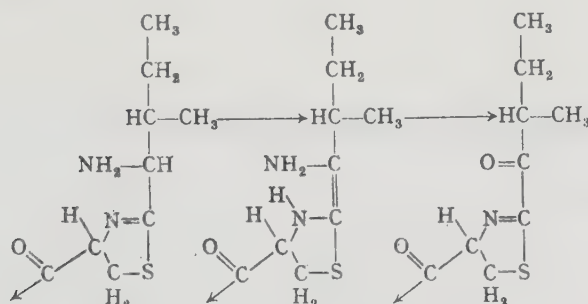


Fig.2. Transformation de bacitracine A en bacitracine F, selon REGNA (1959).

Si son utilisation thérapeutique est restée limitée à l'usage local à cause de sa néphrotoxicité (19),(108), son intérêt est cependant très grand car, contrairement à la plupart des autres antibiotiques, l'apparition de mutants résistants n'existe pratiquement jamais lors de son emploi, même prolongé.

La recherche de ses modalités d'action a fait l'objet de nombreux travaux assez dispersés et fragmentaires, car ils avaient généralement pour but la comparaison des divers antibiotiques; aussi, à l'heure actuelle, nous trouvons-nous devant une bibliographie relativement importante et parfois contradictoire.

Les premières études, dans un but pratique, portent, bien entendu, sur son spectre d'action (4),(6),(12),(16),(24),(29),(30)

(32),(48),(57),(63),(93),(96) et montrent, d'une façon générale, la sensibilité des bactéries Gram-positives, alors que des concentrations élevées de l'antibiotique sont nécessaires à l'inhibition des germes Gram-négatifs.

Puis sont étudiées les conditions de son action : influence des facteurs externes (milieux de culture, pH, température) et internes (état physiologique des germes).

COHEN et PRATT (20) montrent l'importance de la composition du milieu de culture : tryptose et extrait de boeuf diminuent l'activité de la bacitracine, alors que la protéose peptone l'exalte.

On connaissait depuis 1948, par les travaux de ANKER (7), puis ceux de WEINBERG (99) l'inhibition d'action par le dimercapto-propanol, c'est pourquoi on pouvait prévoir une potentialisation par certains ions métalliques : Co^{++} (94), Ni^{++} (109), Cd^{++} (3),(100),(102), Mn^{++} (110), et surtout Zn^{++} (41),(84),(85),(100), qui ont une double action : intensification de l'action bactériostatique de la bacitracine, et sa protection contre la dénaturation au cours du temps. En effet, la fixation de ces ions sur le groupement α -aminé du résidu terminal iso-leucine stabiliserait la molécule en retardant la conversion de la bacitracine A en sa forme F inactive (38). L'atome d'azote du noyau thiazole participerait à la liaison de l'ion métallique (8).

Au contraire, le Cu^{++} , à pH = 8,4, inactive l'antibiotique en jouant le rôle de catalyseur dans une réaction d'oxydation de l'atome de Soufre (81).

Le rôle du Mg^{++} est discuté : activateur pour WEINBERG (100), il est sans action pour ADLER et SNOKE (3).

En corollaire à cette augmentation d'activité généralement provoquée par les ions métalliques, l'E.D.T.A. est trouvé très fortement inhibiteur (3),(84) : ainsi, la concentration minimale inhibitrice de la bacitracine, à l'égard de Staphylococcus aureus sur gélose nutritive, est 770 fois moindre en présence d'une concentration de $Zn^{++} 10^{-4}M$, qu'en présence de la même concentration en E.D.T.A. (103).

L'influence du pH est étudiée par EAGLE, LEVY et FLEISCHMAN (28) : l'activité de la bacitracine croît avec le pH dans les limites de 5,3 à 7,3, puis elle devient irrégulière en milieu alcalin.

L'action de la température est un facteur important, du fait de son retentissement sur l'état physiologique des bactéries, et KLEIN (53) montre qu'une même concentration de bacitracine agit seulement comme bactériostatique à l'égard de Staphylococcus aureus, à 25°C où la multiplication est lente, alors que la même souche est tuée à 37°C où la croissance s'effectue plus rapidement.

Au contraire, pour GUNNISON et coll.(42), l'action bactéricide, toujours à l'égard de St.aureus, est plus intense dans l'eau sur des germes au repos, qu'en bouillon.

Puis, SEIGNEURIN et ACHARD (80) montrent, qu'au cours de la croissance, l'activité bactéricide est stationnaire ou légèrement

décroissante, lorsque les bactéries sont âgées de trois à quatorze heures, puis croît entre quatorze et vingt quatre heures.

PAINE (67), puis GROS, BELJANSKI et MACHEBOEUF (41), pour leur part, rejoignent l'avis de KLEIN (53), suggérant que la pénétration de l'antibiotique se ferait mieux dans les cellules en division qu'au repos.

SNOKE et CORNELL (87) limitent même l'action de la bacitracine au début de la phase de croissance.

Il faut signaler, malgré les divergences d'opinions émises à ce propos, que tous ces auteurs ont travaillé sur St.aureus, la souche variant, il est vrai, selon les expériences.

Ayant observé les conditions d'action de la bacitracine, c'est évidemment la recherche du mécanisme de cette action qui retint plus fortement l'attention des chercheurs.

Par sa structure peptidique d'une part, sa spécificité d'action sur les bactéries Gram-positives d'autre part, la tentation est grande de rapprocher la bacitracine de la pénicilline et PAINE (67) décrit même des bactéries qui, devenant résistantes à la pénicilline, le deviennent en même temps à la bacitracine, ce qui permet d'envisager un mécanisme d'action identique.

Cependant, ce phénomène ne semble pas très général et TREFOUEL (95), pour sa part, nie l'existence de mutations croisées.

De plus, à l'opposé de la pénicilline, il est très difficile

d'obtenir des mutants résistants à la bacitracine, tant "in vitro" (39),(87),(91), qu'"in vivo" (59).

D'autre part, BACHMAN (9), puis JOHNSON et MELENEY (52), JAWETZ et GUNNISON (50), CHABBERT et VERON (18) signalent qu'il existe une potentialisation d'action importante entre la pénicilline et la bacitracine; dès lors, le point d'attaque des bactéries est obligatoirement différent.

Cependant, parallèlement à ce qui a été montré pour la pénicilline, les recherches s'orientent vers la mise en évidence d'une modification de la paroi causée par la bacitracine.

En 1957, ABRAHAM et son école (1),(2),(21),(91), puis WEINBERG (101) signalent que la bacitracine est capable d'induire la lyse de St.aureus; l'année suivante, les premiers auteurs isolent, par hydrolyse chlorhydrique de la bacitracine A, de la Σ -amino-succinyl-lysine qu'ils retrouvent dans la paroi de certaines souches de lactobacilles : une action par compétition de l'antibiotique avec les constituants de la paroi semble ainsi suggérée. Puis ils montrent l'accumulation d'uridine nucléotides, précurseurs du mucopeptide de la paroi, chez St.aureus traité par la bacitracine, comme par la pénicilline et la céphalosporine.

De même, PARK (69),(70), sur milieu spécial permettant l'incorporation des acides aminés dans les parois plutôt que dans les protéines et les acides nucléiques, montre que la présence de bacitracine abaisse

beaucoup le taux de la lysine, ce qui s'accompagne d'une accumulation d'uridine-5-pyrophosphate de N-acétyl-aminosucré, précurseur de la paroi.

MANDELSTAM et ROGERS (60) étendent ce défaut d'incorporation spécifique dans les mucopeptides des parois des bactéries traitées par la bacitracine à d'autres acides aminés : glycine, acide glutamique et alanine.

Mais, au contraire de la pénicilline, la bacitracine est incapable de supprimer la formation des "liaisons croisées" entre peptides dans le dernier stade de la synthèse du mucopeptide (104).

La structure de la paroi, comme élément sensible à la bacitracine, est à nouveau mise directement en cause par STUART et coll.(90) : des mutants de Bacillus megatherium, ayant perdu leur sensibilité au lysozyme, et ayant donc subi une modification pariétale, acquièrent en même temps une résistance à certains antibiotiques, dont la bacitracine.

PERKINS, dans un important article consacré à la paroi bactérienne et à ses modifications sous l'influence des divers antibiotiques (72), rapproche pénicilline et bacitracine par leur action spécifique sur la paroi, mais précise qu'il ne s'ensuit pas nécessairement que le point d'attaque soit le même pour les deux substances.

Si cette action est élective sur la paroi, la présence de milieu hypertonique doit protéger les bactéries : telle est l'hypothèse

avancée et vérifiée par HANCOCK (43). Certains dommages causés par un traitement à la bacitracine, comme la diminution du taux d'acides aminés totaux, et l'inhibition de la synthèse de la β -galactosidase, sont, en effet, empêchés par des milieux de haute pression osmotique (chlorure de sodium, saccharose). Cet auteur conclut que ces effets ne sont que secondaires, faisant suite au blocage de la paroi, mais comme nous le verrons plus loin, par la suite, il révisé ce concept.

Dès 1957, ABRAHAM (1) signale la possibilité d'obtenir des protoplastes sous l'action de la bacitracine, mais ne donne aucun détail sur leur mode de production. GANANCIA (37) en obtient ensuite à partir d'Escherichia coli et les décrit comme étant tout-à-fait identiques à ceux obtenus en présence de pénicilline, avec le passage en "oreilles de lapin" caractéristique.

Par contre, l'essai de SMITH et WEINBERG (86), avec Staphylococcus aureus, aboutit à un échec.

A partir de Proteus rettgeri, KRAWITT et WARD (55) obtiennent des protoplastes, mais ces auteurs précisent qu'à la différence de la pénicilline, la bacitracine n'est jamais capable de provoquer l'apparition de phase L. De même, WILLIAMS (104), puis MOLANDER (61) montrent l'impossibilité de créer des formes L de Staphylococcus aureus en présence de bacitracine.

Un effet secondaire de la modification de la paroi de St.aureus

par la bacitracine, est l'augmentation de la perméabilité cellulaire de ces bactéries, qui se traduit par une stimulation de la réduction du chlorure de triphényl-tétrazolium (T.T.C.) (85).

Cependant, si cette action sur la paroi des bactéries est indéniable (33), elle ne paraît pas être le seul dommage causé par la bacitracine, et son mode d'action semble beaucoup plus complexe : désordres métaboliques, activité au niveau de la membrane cellulaire, perturbation des acides nucléiques.

Pour MANDELSTAM et ROGERS (60), ainsi que pour PARK (70), la bacitracine est sans action sur le métabolisme protéique des bactéries.

D'autres auteurs, au contraire, décrivent l'inhibition de divers enzymes : β -galactosidase (22), (84), mannitol-déshydrogénase (84), α -hémolysine (47). Pour SMITH et WEINBERG (84), cette action rapprocherait la bacitracine du chloramphénicol, et la différencierait de la pénicilline.

Par contre, la glycopeptide-synthétase de la paroi est assez peu touchée (5), et la synthèse de la protéine M de Streptococcus pyogenes n'est nullement perturbée (15).

Mais, pour s'assurer que les divers troubles observés ne sont pas secondaires à la déficience pariétale, plusieurs chercheurs ont travaillé sur des bactéries dépourvues de parois : bactéries désintégrées, ou protoplastes.

De très belles expériences sont ainsi effectuées par GALE et FOLKES, à Cambridge, sur des cultures de Staphylococcus aureus soumises aux ultra-sons. Après avoir montré que, dans certaines conditions, le métabolisme des protéines et des acides nucléiques peut se poursuivre (34), ces auteurs étudient la répercussion, sur ces germes désintégrés, d'un contact avec certains antibiotiques, et constatent que la bacitracine (35) peut inhiber totalement la synthèse des protéines et des acides nucléiques, mais seulement pour une concentration cent fois supérieure à la concentration bactériostatique. Elle perturbe l'incorporation d'acides aminés marqués aussi bien chez les cellules ultra-sonnées que chez les cellules intactes (36), et le pourcentage d'inhibition diffère selon les acides aminés : 57 % d'inhibition pour la glycine, 0 % pour l'arginine. Elle empêche la synthèse d'enzymes induits, comme la β -galactosidase, mais elle est sans action sur la catalase.

D'autre part, travaillant sur la succino-déshydrogénase, obtenue à l'état pur à partir d'un bacille diphtérique, STRAUSS et JANN (88) notent que, contrairement à la polymyxine, la bacitracine est dénuée d'action sur cet enzyme.

Sans aller jusqu'à rompre les cellules, mais toujours pour mettre la paroi hors de cause, certains auteurs ont utilisé comme matériel d'étude, des protoplastes obtenus après traitement par le

lysozyme, ou la pénicilline, mais des résultats assez contradictoires ont été obtenus.

La plupart des souches mises en essai par WARD (97), Gram positives ou négatives, ont été trouvées plus sensibles que les parents intacts, excepté quelques souches de Streptococcus devenues plus résistantes.

Cette résistance accrue des formes L de Streptococcus est confirmée par ROTTA et coll.(77).

Par contre, des divergences d'opinion se manifestent au sujet de la sensibilité des formes L de Staphylococcus aureus : trouvées plus sensibles par WILLIAMS (104), elles paraissent plus résistantes que les formes parentales à MOLANDER (61).

Mais, à la différence des auteurs précédents qui notent un écart d'activité (en plus ou en moins), SHOCKMAN et LAMPEN (82), travaillant sur des protoplastes bactériens (Streptococcus foecalis) et de levures (Saccharomyces cerevisiae), notent une grande différence entre les inhibiteurs vrais de la synthèse de la paroi (type pénicilline et cyclosérine), et les autres antibiotiques (dont la bacitracine) qui inhibent à la même concentration protoplastes et organismes intacts.

Cette concentration inhibitrice identique vis-à-vis des germes entiers et de leurs protoplastes, est confirmée par HANCOCK et FITZ JAMES (44) sur Bacillus megatherium, ce qui les amène à réviser leur théorie sur le mode d'action primaire de la bacitracine (voir p.8)

et à penser que l'action sur la membrane est réellement le lieu d'attaque, l'inhibition de la paroi n'en étant qu'une conséquence.

SNOKE et CORNELL (87) parviennent aux mêmes conclusions : formant des protoplastes d'un germe sensible (Micrococcus lyzodeikticus) et d'un germe résistant (Bacillus licheniformis, d'une souche productrice de bacitracine), et faisant agir l'antibiotique, ces auteurs montrent que la sensibilité devient identique. C'est donc la perméabilité de la paroi qui conditionne la sensibilité différente, mais le siège de la toxicité est ailleurs, puisque celle-ci est identique après que l'antibiotique ait pu pénétrer dans le corps bactérien, et c'est la membrane bactérienne qui est en cause.

Ce mode d'action sur la membrane avait été entrevu, dès 1962, par HELMS et WEINBERG (45), qui ont montré que la bacitracine abaissait la tension superficielle de l'eau, mais ceci cependant beaucoup plus discrètement que certains surfactants, tel le C.T.A.B. (bromure de cétyle-triméthyl-ammonium), et ce point de vue est repris plus tard par NEWTON (65), puis par FLOUVAT (31).

La sensibilité de la membrane bactérienne à la bacitracine, aboutissant à une déficience de la paroi, est aussi mise en cause par SIEWERT et STROMINGER (83), qui démontrent que cet antibiotique inhibe une réaction de déphosphorylation des lipides pyrophosphates, qui est l'un des stades de la formation de la paroi bactérienne, cette réaction ayant lieu au niveau de la membrane cellulaire.

Très récemment, et de toute autre manière, RIEBER, IMAEDA et CESARI (76) mettent en évidence la toxicité de la bacitracine au niveau de la membrane et des processus vitaux dont elle est le siège. Ces chercheurs, photographiant au microscope électronique des Mycobacteria traités par la bacitracine, observent que le premier signe de modification dans l'ultrastructure des bactéries est la désorganisation de la membrane plasmatique qui devient fibrillaire, et des mésosomes qui disparaissent lorsque la concentration antibiotique s'élève.

Plus profondément encore, est situé le point d'attaque de la bacitracine pour GROS, MACHEBOEUF et BELJANSKI (40). Dans des travaux déjà anciens (1951), ces chercheurs montrent que la bacitracine inhibe le catabolisme oxydatif de l'acide guanylique de façon très profonde, et, rapprochant ce fait du trouble d'incorporation des acides aminés suggèrent que cette action peut être due à une "perturbation du transfert énergétique des acides aminés à travers la membrane.....L'action sur l'anabolisme protidique ne serait qu'une conséquence du trouble du métabolisme des ribonucléotides".

Ces très nombreuses publications que nous venons rapidement de passer en revue, nous dévoilent le mode d'action de la bacitracine, selon des angles différents, souvent étroits, avec quelques discordances parfois, mais leur but n'était pas, pour la plupart, l'étude de

ce mode d'action proprement dit, mais plutôt tel ou tel phénomène au sujet des antibiotiques en général, ou de l'un d'eux plus particulièrement, et le choix de la bacitracine comme matériel d'étude, n'était que comparatif.

TRAVAUX PERSONNELS

La plupart des travaux de recherche sur le mode d'action de la bacitracine ont été assez fragmentaires, et effectués dans des conditions très variables, ce qui permet d'expliquer certaines divergences dans les résultats obtenus par les différents chercheurs, mais ce qui en rend très difficile la synthèse.

De plus, si la multiplicité des lésions provoquées chez les bactéries par cet antibiotique, semble un fait acquis, il y a certainement une action primaire qui déclenche de nombreux effets secondaires, et ce "primum movens" n'apparaît pas clairement à l'heure actuelle.

C'est pourquoi, nous avons pensé intéressant de reprendre certains essais, dans des conditions de travail le plus unifié possible, à la fois sur Staphylococcus aureus (souche Oxford), germe bien sensible, et sur Escherichia coli (souche Lausanne 416), naturellement plus résistant, les différences d'action à l'égard de ces deux espèces bactériennes pouvant, peut-être éclairer le problème sous un jour nouveau.

Nos recherches ont porté sur les points suivants :

A/ DETERMINATION DE L'ACTIVITE BACTERIOSTATIQUE

de la bacitracine : aspect des courbes de croissance en présence de concentrations infra-bactériostatiques de l'antibiotique.

B/ DETERMINATION DE L'ACTIVITE BACTERICIDE :

évolution du nombre de survivants en fonction du temps de contact avec l'antibiotique et de l'état physiologique des bactéries.

C/ ETUDE DE L'ACTION SUR LA PAROI BACTERIENNE :

induction de la lyse et ses modalités. Recherche d'obtention de protoplastes.

D/ ETUDE DE LA RESPIRATION DES BACTERIES en présence

de bacitracine : influence du substrat mis en oeuvre.

E/ DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES (D.N.A. et R.N.A.)

des bactéries soumises à l'action de la bacitracine.

A/ DETERMINATION DE L'ACTIVITE BACTERIOSTATIQUE

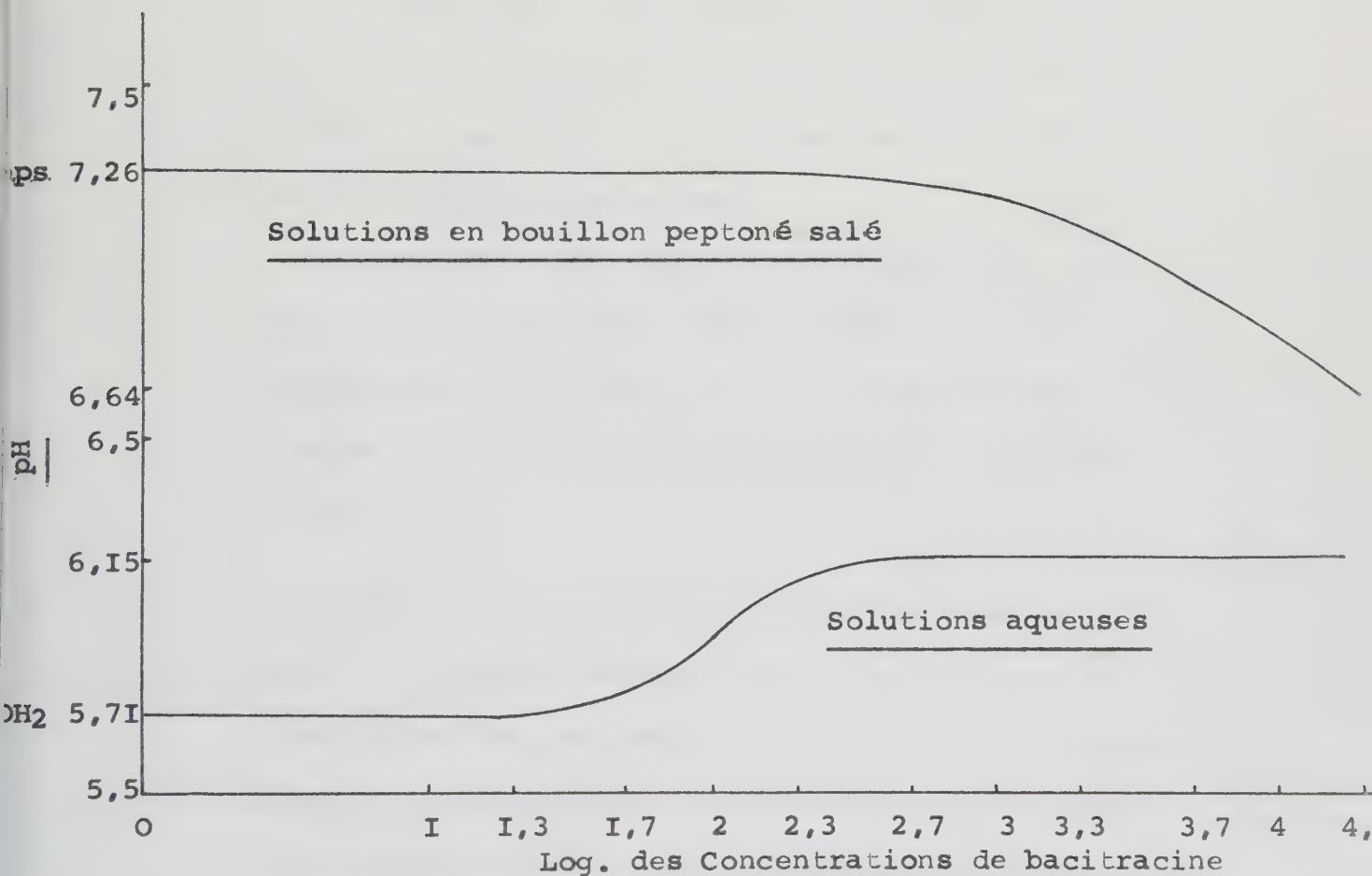
=====

Avant d'entreprendre aucun travail, puisque certains auteurs ont signalé l'importance de la valeur du PH dans l'activité de la bacitracine, il importait de déterminer le pH des solutions de l'antibiotique aux diverses concentrations, d'une part en eau distillée, et d'autre part en bouillon peptoné salé (formule de la Pharmacopée française), milieu de culture que nous avons utilisé au cours de nos essais.

Nous reproduisons sur la courbe n° 1 les valeurs obtenues, en portant en abscisses les logarithmes des concentrations de bacitracine exprimées en microgrammes, et en ordonnées les valeurs de pH correspondantes.

Nous constatons que, même pour de très fortes concentrations (20 000 µg/ml) de l'antibiotique, les valeurs du pH des solutions ne sont pas sensiblement modifiées : ainsi, le pH du bouillon a varié de 7,26 à 6,64, et celui des solutions aqueuses de 5,71

à 6,12. Ce facteur ne pourra donc pas influencer de façon considérable les résultats, lorsque la seule variable sera la concentration de l'antibiotique.



Courbe n° I - Variations du pH des solutions de bacitracine en eau
ou en bouillon peptoné salé .

Cet essai préliminaire effectué, il fallait, dans un premier temps, déterminer la concentration minimale inhibitrice de bacitracine, pour la multiplication des souches choisies comme matériel d'étude : Staphylococcus aureus, souche Oxford
Escherichia coli, souche Lausanne 416.

Cette détermination était effectuée selon la méthode des dilutions classique : mise en présence, sous un volume constant de milieu de culture, d'une quantité fixe de germes, avec une quantité variable de l'antibiotique en essai.

La concentration bactériostatique était déterminée comme étant la moyenne entre la plus faible concentration inhibant le développement de la culture, et la plus forte concentration permettant une prolifération. Elle est exprimée en microgrammes par millilitre.

Dans une série de tubes, des quantités croissantes de bacitracine en solution aqueuse étaient introduites, sous un volume de 5 ml. Ces tubes étaient alorsensemencés par 5 ml d'une suspension, en bouillon peptoné salé à double concentration, de bactéries contenant deux millions de bactéries par ml, ce qui donnait une teneur finale en bactéries de un million par ml, et un volume total de 10 ml.

Cette suspension était préparée par dilution convenable dans le milieu de culture, d'une suspension en eau physiologique,

obtenue à partir d'une culture de dix huit heures sur bouillon gélosé, la quantité de germes étant appréciée d'après l'opacité des suspensions à l'électrophotomètre de MEUNIER, selon la technique de DESVIGNES (25).

Pour chaque série d'essai, deux tubes témoins étaient préparés de la même manière, l'un, sans substance antiseptique, pour vérifier la bonne vitalité de la souche bactérienne, et l'autre, sans bactéries, pour vérifier la stérilité du milieu de culture et de l'eau distillée utilisée, ainsi que l'aseptie des manipulations.

Tous les tubes étaient portés à l'étuve à 37°C pendant 24 heures; après ce temps d'incubation, on notait les tubes dans lesquels une culture s'était développée.

Les résultats obtenus sont inscrits sur les tableaux I et II. Trois essais successifs ont été effectués lors de chaque détermination, et nous retenons la valeur moyenne de ces essais.

La concentration bactériostatique de la bacitracine apparaît alors être de : 10 µg/ml à l'égard de Staphylococcus aureus,

souche Oxford

2 000 µg/ml à l'égard d'Escherichia coli, souche

Lausanne 416.

D'autre part, nous avons enregistré les courbes de croissance de ces deux souches bactériennes, dans les conditions expérimentales

précédemment décrites, à l'aide d'un biophotomètre enregistreur de type BONET-MAURY et JOUAN (14).

En début d'expérience, les suspensions additionnées ou non d'antibiotique, étaient placées dans les cuves de l'appareil, dont l'intensité lumineuse était réglée, pour chacune, à 100 % de lumière transmise, et l'opacité des cultures était enregistrée durant trente six heures.

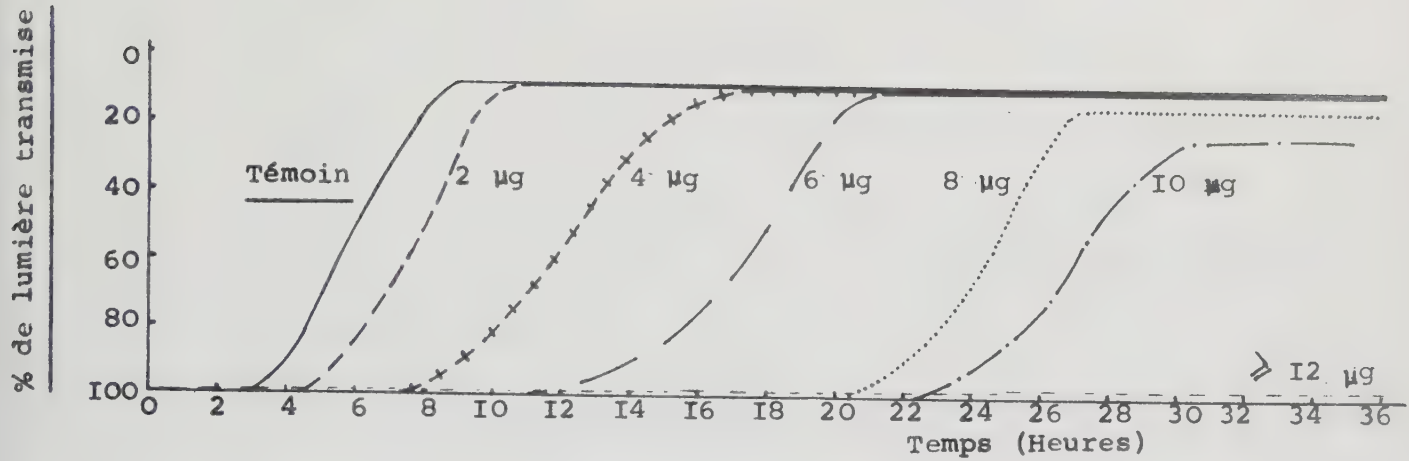
Notons, dès maintenant, que, ce que nous observons sur les courbes d'enregistrement (courbes n° 2 et 3) est la résultante de la multiplication des germes et de leur lyse éventuelle. Au début de ces essais, la lyse seule ne peut s'observer car la suspension bactérienne à cette concentration (un million par ml) ne provoque aucun trouble, mais une multiplication retardée peut être due, soit à une phase de latence réelle, soit à une lyse égale ou supérieure à la multiplication.

Avec Staphylococcus aureus (courbe n° 2), une concentration de bacitracine de 2 µg/ml produisait un léger retard de culture; avec 12 µg/ml, la multiplication des bactéries ne s'effectuait pas, même après trente six heures d'incubation.

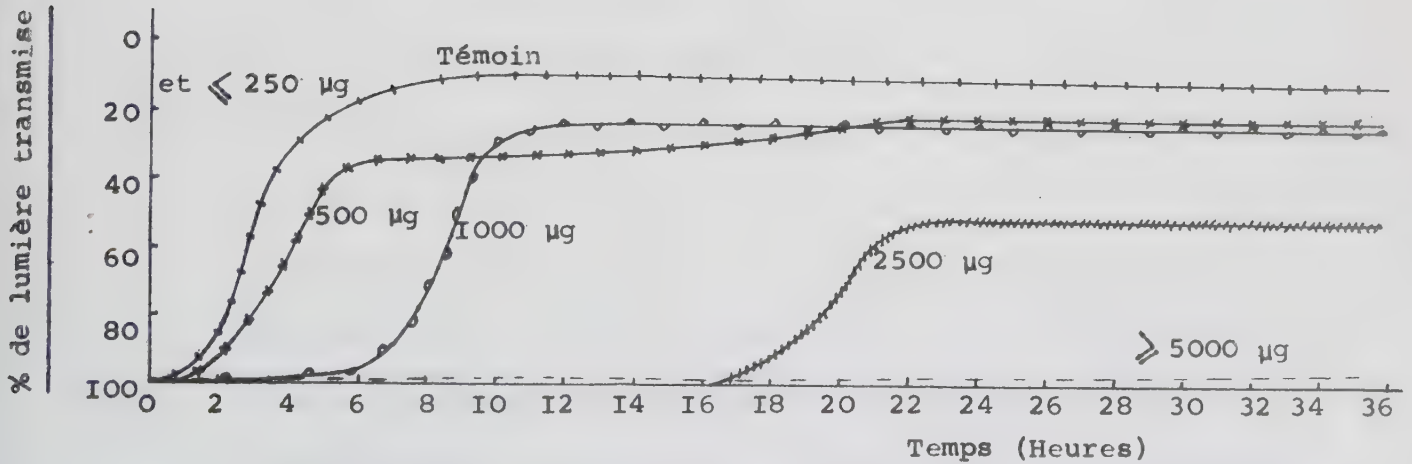
Avec Escherichia coli (courbe n° 3), pour une concentration de 250 µg/ml, aucune action ne se manifestait. La culture était ralentie pour des concentrations allant de 500 à 2 500 µg/ml, et l'opacité maximale atteinte diminuait. Enfin, il y avait inhibition

Action de la bacitracine

sur la croissance des bactéries



Courbe n°2 - *Staphylococcus aureus*



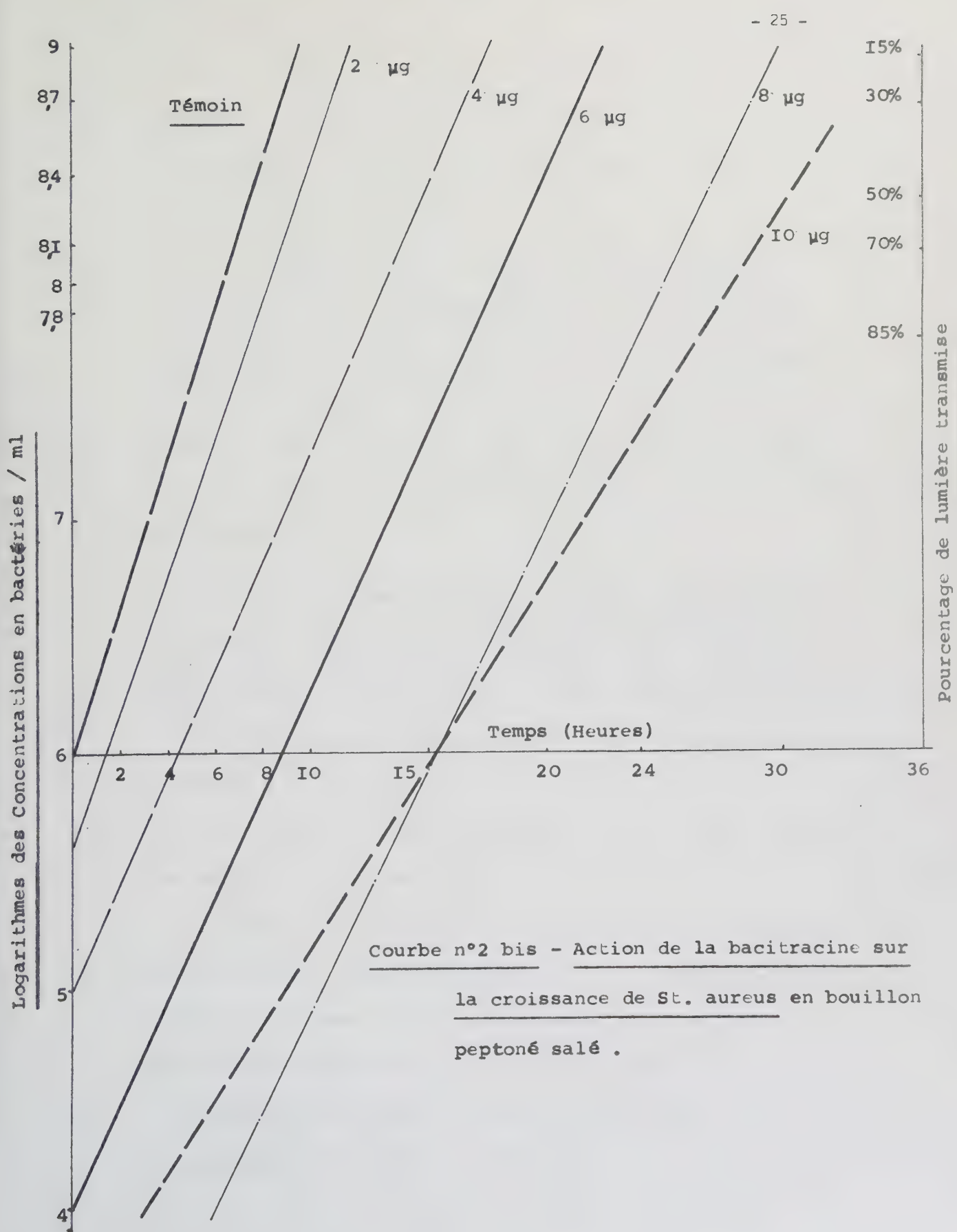
Courbe n°3 - *Escherichia coli*

de la multiplication lorsque les concentrations d'antibiotique atteignaient 5 000 $\mu\text{g/ml}$.

Remarquons que ces résultats coïncident avec ceux trouvés lors de la détermination de l'activité bactériostatique par la méthode classique dans le cas du staphylocoque, mais qu'avec le colibacille, nous obtenons ici une activité légèrement inférieure. Ceci tient au fait que les cultures étaient, dans ces essais, agitées et fortement éclairées, l'agitation favorisant la multiplication, et l'éclairement des cuves du biophotomètre ayant peut-être une action inactivante sur la bacitracine.

Si, comme l'a fait DUCHENNE (27), nous reproduisons ces courbes en portant en abscisses les durées d'incubation, et en ordonnées les logarithmes des concentrations bactériennes par ml, correspondant à chaque opacité des cultures, nous constatons que, vis-à-vis de Staphylococcus aureus (courbe n° 2 bis), en présence de concentrations de bacitracine comprises entre 2 et 8 $\mu\text{g/ml}$, les courbes de croissance sont des droites, et celles-ci sont approximativement parallèles à la courbe témoin, ce qui signifie que le temps de génération n'est pas modifié. Pour une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$, très proche de la concentration inhibitrice, la pente de la courbe est un peu différente de celle du témoin sans antibiotique, et le temps de génération semble légèrement allongé.

D'autre part, si l'on prolonge les courbes jusqu'à l'axe des



ordonnées, nous vérifions que la courbe de référence coupe bien cet axe au point 6 correspondant à un million de germes, quantité introduite en début d'expérience.

En prolongeant de la même façon les droites correspondant à chaque quantité de l'antibiotique introduit, on détermine des valeurs beaucoup plus basses, signifiant que le nombre de germes capables de se multiplier, était, au départ, très réduit : par exemple, en présence de 4 µg/ml de bacitracine, la courbe montre qu'au temps zéro, 10^5 bactéries seulement ont conservé leur pouvoir de prolifération.

Mais, pour se permettre une telle extrapolation, il faut s'assurer que la morphologie des bactéries n'a pas été modifiée par la présence de l'antibiotique. En effet, une méthode turbidimétrique n'est valable que pour des suspensions homogènes, et morphologiquement invariables.

Aussi avons-nous observé au microscope à contraste de phase les bactéries en cours de croissance.

La bacitracine, aux concentrations de 2 à 8 µg/ml, ne modifiait pas sensiblement l'aspect de St.aureus, si ce n'est que les cocci restaient généralement isolés ou associés par deux, au lieu de former les amas caractéristiques; à la concentration de 10 µg/ml, les nombreux agrégats formés pouvaient, peut-être, être rendus responsables de la modification de la pente de la courbe.

Au contraire, avec E.coli, la présence de bacitracine conférait un aspect très polymorphe à la souche, puis les bacilles perdaient leur mobilité; certains devenaient très courts, trappus, tandis que d'autres prenaient la forme filamenteuse, et de gros agrégats se formaient. Ces variations de morphologie nous interdisaient de convertir les opacités mesurées en nombre de germes avec une parfaite rigueur.

Ainsi, nous pouvons dire que la bacitracine, aux concentrations infra-bactériostatiques, provoque un retard dans l'apparition des cultures : celui-ci n'est pas dû, au moins dans le cas de St.aureus, à l'allongement du temps de génération, mais à une diminution du nombre de bactéries capables de prolifération, ce qui nous laisse supposer une action bactéricide.

B/ DETERMINATION DE L'ACTIVITE BACTERICIDE

=====

Cherchant à mettre en évidence l'influence de l'état physiologique des bactéries sur leur sensibilité à la bacitracine, l'activité bactéricide de l'antibiotique, à l'égard de Staphylococcus aureus et d'Escherichia coli, a été déterminée comparativement sur des germes en pleine phase de multiplication (culture âgée de deux heures), et à l'état de repos (culture âgée de vingt quatre heures), le contact avec l'antibiotique étant effectué, dans chaque cas, en bouillon et en eau physiologique.

La technique utilisée était celle exposée par BERNARD et LAMBIN (11) au sujet d'autres antibiotiques, à la différence près que les bactéries étaient récoltées par centrifugation et lavées en eau physiologique avant leur mise en contact avec la bacitracine. Elles étaient introduites dans les milieux d'essai, à raison de un million par ml (mesure effectuée à l'électrophotomètre de MEUNIER), titre que nous avons adopté lors de la détermination de l'activité bactériostatique.

Les concentrations de bacitracine mises en jeu étaient de 50 et 500 µg/ml pour St.aureus, et de 5 000 et 20 000 µg/ml

pour E.coli, une culture sans antibiotique étant toujours effectuée comme témoin.

Dès l'addition des germes (temps zéro), dans chaque tube, un prélèvement de 0,1 ml était effectué, et transporté dans 100 ml d'eau distillée stérile; puis, 0,1 ml de cette dilution était étalé sur un bouillon gélosé contenu en boîte de Pétri.

La même opération était répétée après trente minutes, une heure, deux heures, quatre heures et vingt quatre heures d'incubation à 37°C, et chaque essai était pratiqué en double exemplaire.

Après vingt quatre heures d'incubation à 37°C, ces subcultures étaient dénombrées : nous avons d'abord constaté qu'au temps zéro, le nombre de colonies qui se développaient, aux erreurs expérimentales près, était équivalent à partir du tube témoin ou bien à partir des plus fortes concentrations de l'antibiotique, c'est-à-dire, qu'après de telles dilutions, l'effet bactériostatique ne pouvait plus perturber les numérations.

Les résultats obtenus sont transcrits sur des courbes, en portant en abscisses les temps de contact bactéries-bacitracine, et en ordonnées les pourcentages de survivants, en prenant par définition 100 % au temps zéro.

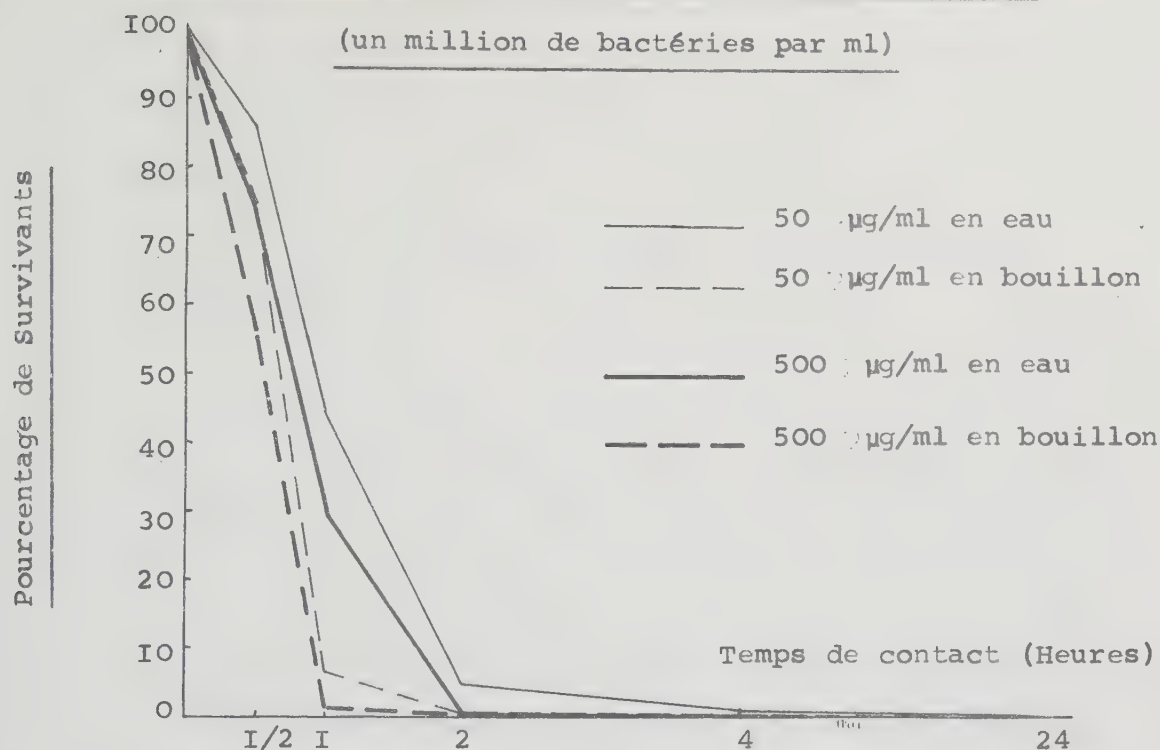
1) Activité bactéricide à l'égard de St.aureus.

a)- Lorsque les bactéries étaient âgées de deux heures, c'est-à-dire en pleine activité métabolique, et qu'elles étaient transportées dans un milieu de culture neuf (courbe n° 4, traits pointillés), l'activité bactéricide était intense et rapide avec les deux concentrations à l'essai : ainsi, après une heure de contact avec la bacitracine, 2 à 7 % des bactéries seulement étaient encore capables de se multiplier.

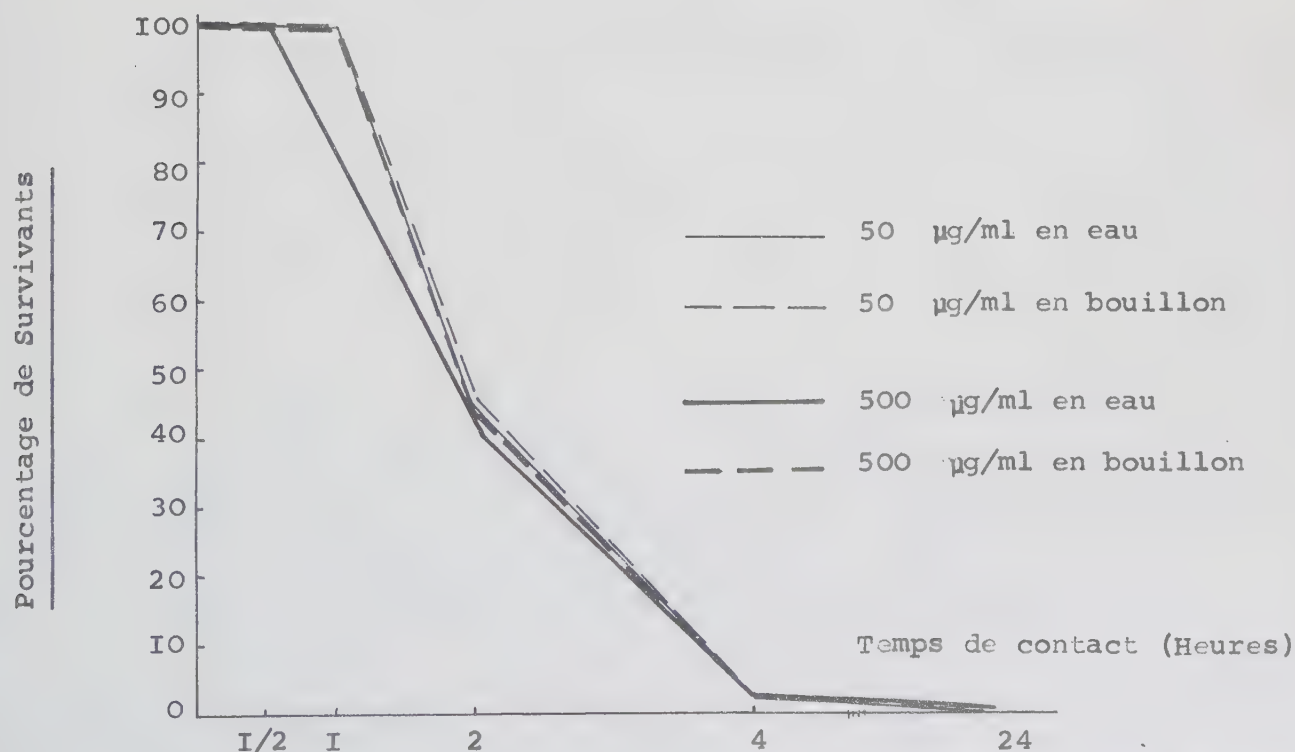
Au contraire, lorsque ces bactéries étaient privées de substances nutritives (courbe n° 4, traits pleins), et que, seule l'activité métabolique "résiduelle" demeurait, l'action était plus tardive (31 à 45 % de bactéries survivantes après une heure de contact).

Cependant, après deux heures de contact, dans les deux cas, 2 à 5 % seulement des germes conservaient encore leur pouvoir de prolifération.

b)- Lorsque les bactéries étaient âgées de vingt quatre heures, que le contact ait lieu en eau physiologique ou en bouillon (courbe n° 5), l'activité de la bacitracine semblait identique et lente à s'établir : elle était à peu près nulle après une heure (78 à 100 % de survivants); 40 % des bactéries pouvaient encore se multiplier après un contact de deux heures, mais seulement 2 à 3 % après vingt quatre heures.



Courbe n°4 - Bactéries en phase de multiplication (culture âgée de 2 heures)



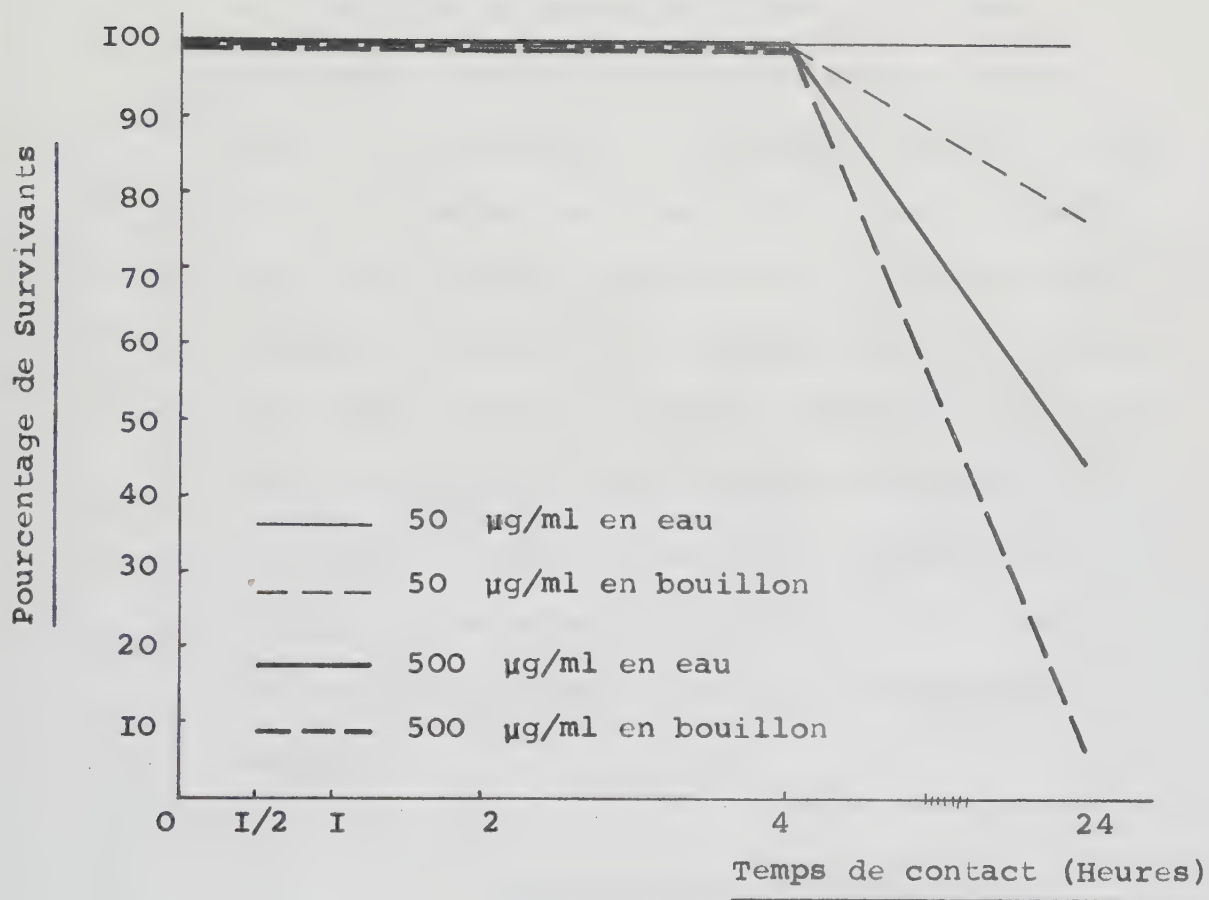
Courbe n°5 - Bactéries ayant achevé leur multiplication (culture âgée de 24h)

Au cours de tous nos essais, l'extinction totale des cultures n'était généralement pas obtenue, même après vingt quatre heures, mais il faut noter que ce fait a déjà été remarqué pour d'autres antibiotiques (11) ou antiseptiques (78) considérés comme bactéricides.

c)- D'autre part, nous avons recherché le rôle éventuel du nombre de germes dans l'action de la bacitracine, et nous avons déterminé l'activité bactéricide en introduisant l'antibiotique dans des suspensions, en eau physiologique et en bouillon, de bactéries âgées de vingt quatre heures, et titrant un milliard de germes par ml.

Les résultats obtenus sont transcrits sur la courbe n° 6. Après quatre heures de contact, aucune action bactéricide ne se faisait sentir dans ces conditions. Après vingt quatre heures, l'action dépendait de la concentration utilisée, et pour chaque concentration, elle était plus active en bouillon (pour 50 µg/ml, 100 % de survivants en eau physiologique ou 75 % en bouillon; pour 500 µg/ml, 45 % en eau physiologique et 8 % en bouillon).

Comme il fallait s'y attendre, l'accroissement du nombre des bactéries a abaissé le pouvoir bactéricide de la bacitracine, mais, sur ces bactéries âgées, au moins pendant les quatre



Courbe n°6 - Action bactéricide de la bacitracine sur *St. aureus*
(1 milliard/ml) âgé de 24 h .

premières heures, il n'y avait pas de différence d'action en présence ou en l'absence de substances nutritives.

L'ensemble de ces résultats montre que la bacitracine exerce, à l'égard de St.aureus, une action bactéricide élective sur les bactéries en phase de multiplication, et permet de penser que son action bactériostatique est immédiate : en effet, l'action létale était très intense à l'égard des bactéries proliférantes (culture âgée de deux heures, avec mise en contact en bouillon, et à un moindre degré en eau physiologique), mais elle était très retardée et très affaiblie à l'égard des bactéries quiescentes (culture âgée de vingt quatre heures). Dans ce cas, les courbes d'action bactéricide étaient pratiquement superposées, quelque soit le milieu d'étude : les substances nutritives ne semblent donc plus utilisables dans ces conditions, ce qui revient à dire que l'activité métabolique des bactéries est immédiatement supprimée.

2) Activité bactéricide à l'égard d'E.coli.

Les mêmes déterminations ont été effectuées avec E.coli, avec des concentrations de bacitracine de 5 000 et 20 000 µg/ml, et les résultats ont été notoirement différents de ceux obtenus avec St.aureus.

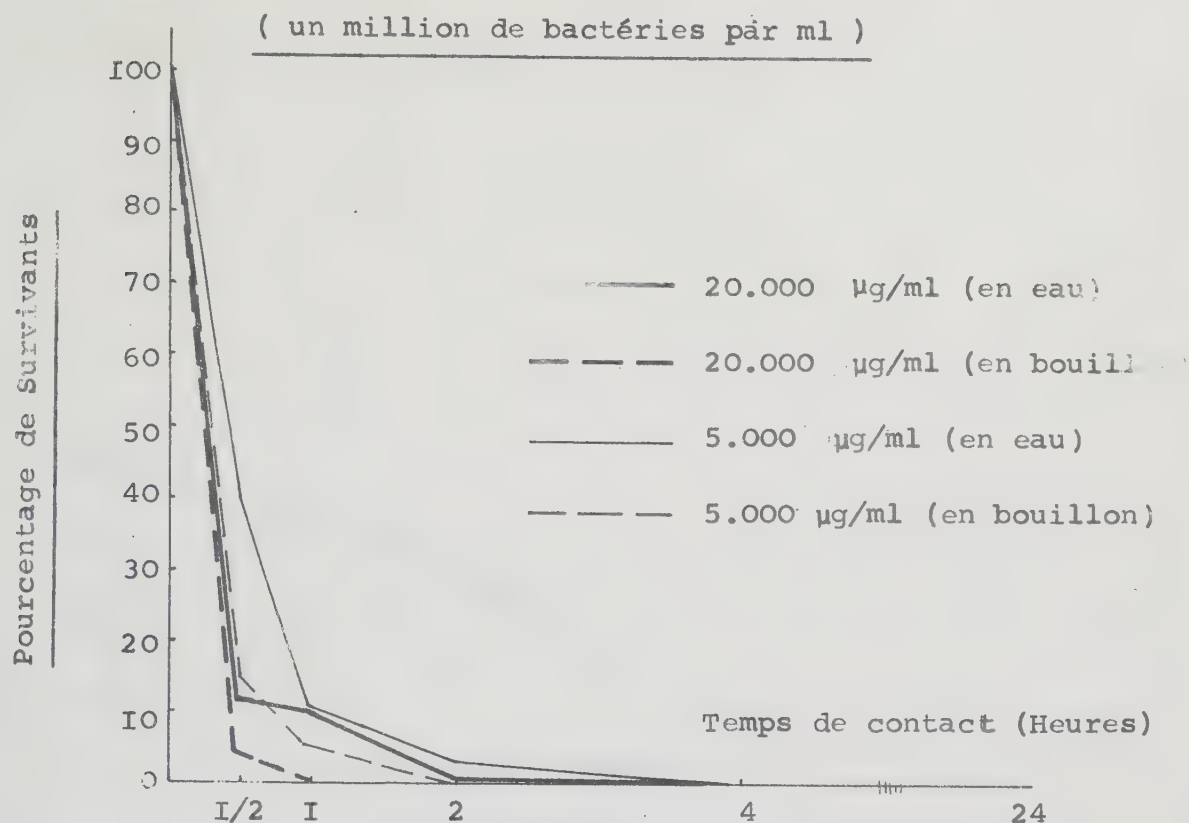
a)- Lorsque les bactéries étaient âgées de deux heures, et à la concentration de un million par ml, nous obtenions une sensibilité plus grande si le contact avec l'antibiotique avait lieu en bouillon (courbe n° 7), et nous avons pratiquement toujours obtenu une bactéricidie totale après un contact de quatre heures.

L'allure des courbes était, dans ce cas, assez proches de celles obtenues dans les mêmes conditions avec St.aureus (courbe n° 4).

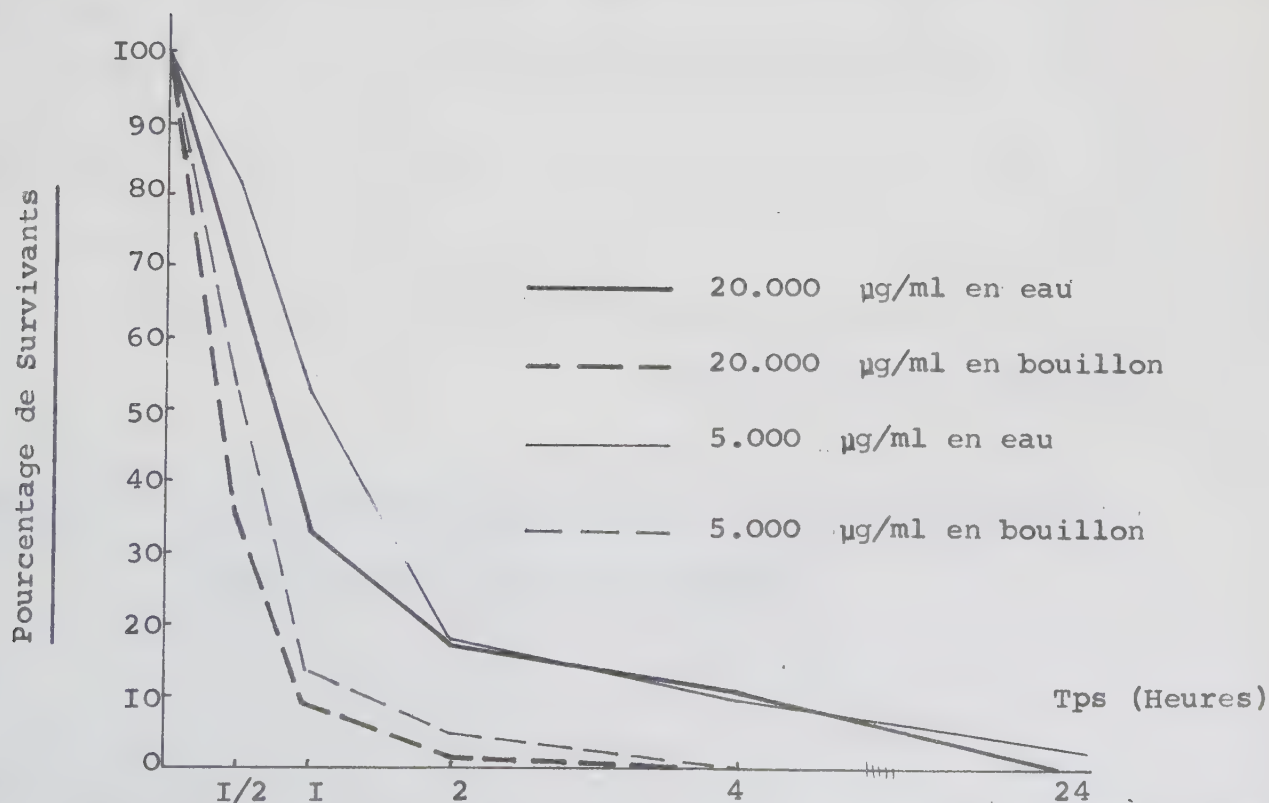
b)- Sur des bactéries quiescentes (courbe n° 8), à la condition d'ajouter des substances nutritives (traits pointillés), on retrouvait une action bactéricide intense (un peu décalée dans le temps, et totale après quatre heures.

Par contre, en eau physiologique (traits pleins), les survivants étaient beaucoup plus nombreux (52 % après une heure, au lieu de 14 % en bouillon), et un petit nombre de germes résistait après vingt quatre heures de contact.

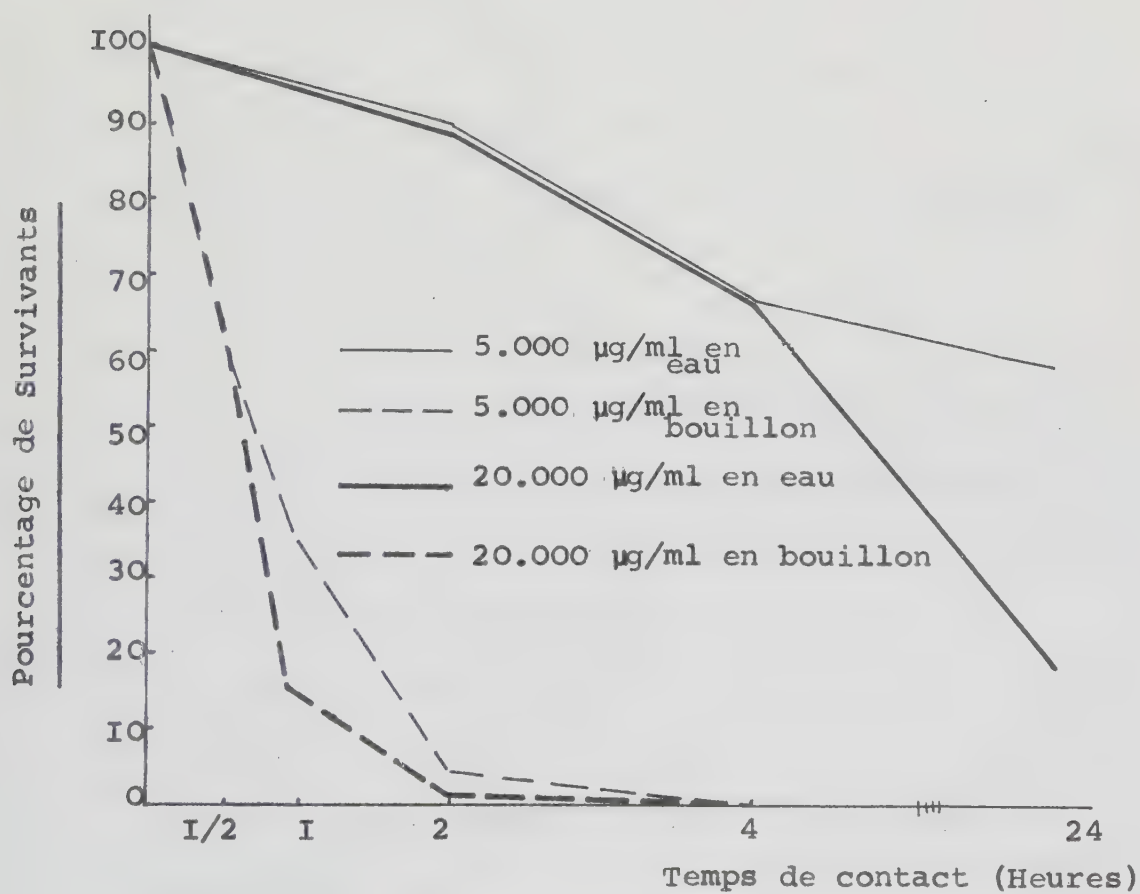
c)- L'importance du milieu était encore beaucoup plus nette lorsque l'essai était effectué avec un milliard de germes par ml (courbe n° 9) : dans ce cas, 89 % des bactéries résistaient après deux heures si le contact avait lieu en eau physiologique, et seulement 2 à 5 % en bouillon.



Courbe n°7 - Bactéries en phase de multiplication (culture âgée de 2 heures)



Courbe n°8 - Bactéries ayant achevé leur multiplication (culture âgée de 24h)



Courbe n°9 - Action bactéricide de la bacitracine sur *E. coli*
(1 milliard/ml) âgé de 24 heures

La bacitracine exerce donc une importante activité bactéricide à l'égard d'E.coli en activité métabolique (bactéries âgées de deux heures) et spécialement sur les bactéries proliférantes (en bouillon).

En présence de matières nutritives, l'action se manifestait sur les bactéries âgées comme sur les jeunes cultures, ce qui laisse supposer que l'action n'est pas immédiate, et que, après un temps de latence pendant lequel la multiplication (ou au moins certaines synthèses) peut s'établir, les bactéries deviennent vulnérables à son action.

Dans le chapitre précédent, nous avons supposé, d'après l'examen des courbes de croissance de St.aureus en présence de concentrations infra-bactériostatiques de bacitracine que le nombre de germes devait décroître très rapidement.

Dans ces essais, utilisant des concentrations supra-bactériostatiques et les éliminant ensuite, nous avons pu vérifier cette hypothèse pour St.aureus ainsi que pour E.coli, et apporter quelques précisions :

1) l'action bactéricide s'exerce électivement, pour ces deux espèces bactériennes, lorsque celles-ci sont douées d'activité métabolique, c'est-à-dire sur des germes prélevés en phase logarithmique de croissance, et spécialement si le contact a

lieu en présence de substances nutritives.

2) sur ces deux espèces bactériennes à l'état quiescent (bactéries âgées en eau physiologique), l'action est considérablement retardée et affaiblie.

3) les deux espèces bactériennes réagissent très différemment lorsque l'antibiotique est mis en contact avec des bactéries âgées en présence de métabolites : l'action bactéricide est faible pour St.aureus, comme si toute activité métabolique était immédiatement suspendue; au contraire, l'activité létale à l'égard d'E.coli est totalement conservée, suggérant que les substances nutritives peuvent être encore utilisées, au moins pendant un certain temps.

C/ ACTION SUR LA PAROI BACTERIENNE

=====

Après avoir déterminé les concentrations de bacitracine inhibant la multiplication de nos souches bactériennes, et, dans quelles conditions, ce pouvoir devenait létal, nous abordons le problème majeur de savoir quel est le point d'attaque des bactéries : paroi, membrane, protéines cellulaires, acides nucléiques ?

Pour étudier les modifications de la paroi bactérienne sous l'influence de l'antibiotique, d'une part, nous avons suivi, en enregistrement continu, l'opacité des cultures proliférantes ou quiescentes mises en contact avec des concentrations supra-bactériostatiques de bacitracine, et d'autre part, nous avons cherché à produire des protoplastes en milieu hypertonique.

I - ETUDES TURBIDIMETRIQUES

1) Action de la bacitracine sur des bactéries âgées de 18 heures

Les concentrations bactériennes de un million par ml, utilisées dans les travaux antérieurs, laissant le milieu limpide (cf.p.22), nous avons été contrainte à utiliser des concentrations très supérieures (500 millions par ml) pour déceler une lyse éventuelle.

La suspension de germes était préparée en eau physiologique ou en bouillon peptoné salé, à partir d'une culture de dix huit heures sur bouillon gélosé, et répartie, à raison de 9 ml, dans les cuves du biophotomètre. L'appareil était alors réglé arbitrairement, pour toutes les cuves, à 50 % de lumière transmise, et 1 ml d'une solution d'antibiotique à diverses concentrations était ajouté dans chaque cuve.

En eau physiologique, c'est-à-dire sur des germes au repos, aucune action lytique ne se manifestait, ni avec Staphylococcus aureus (courbe n° 10), ni avec Escherichia coli (courbe n° 12). L'opacité diminuait très légèrement en vingt quatre heures, de façon similaire en présence ou en absence d'antibiotique, mais ce n'était que le reflet de la lyse physiologique des bactéries sénescents.

En bouillon, par contre, avec St.aureus (courbe n° 11), après une courte phase de lyse commune au témoin et aux cultures

effectuées en présence d'antibiotique (*), la multiplication était fortement retardée pour les faibles concentrations de bacitracine (20 µg/ml); une lyse apparaissait avec 50 µg/ml; elle restait progressive et lente à s'établir, mais devenait maximale pour 5 000 µg/ml, puis son intensité diminuait pour 10 000 et 20 000 µg/ml.

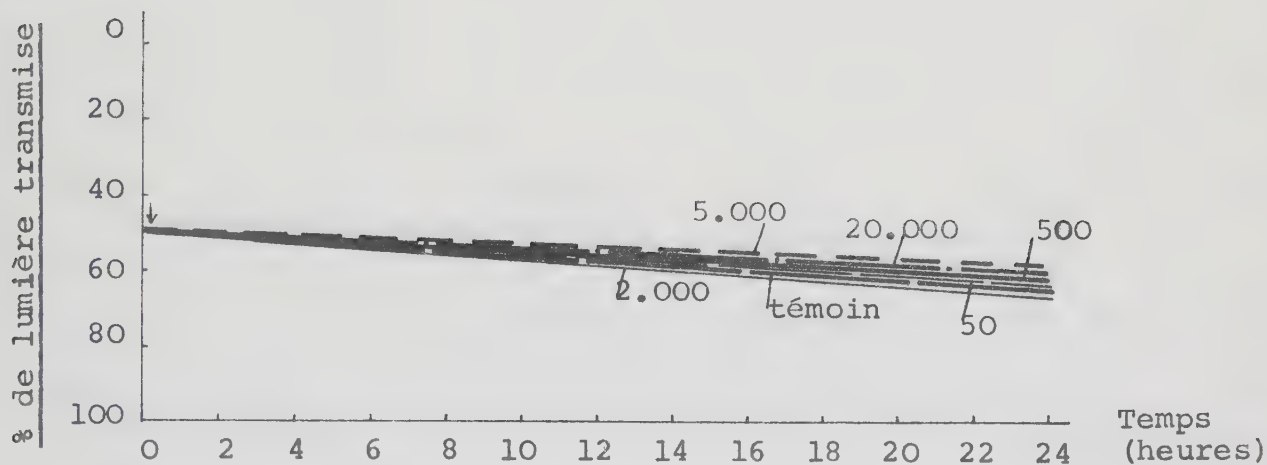
Cette régression dans la lyse peut être imputée au fait qu'à ces fortes concentrations, il y avait agglutination des bactéries, ce que nous avons pu vérifier par un examen microscopique de ces cultures.

Avec E.coli, (courbe n° 13), la multiplication débutait après un court temps de latence, mais sans lyse initiale. La diminution d'opacité qui survenait environ deux heures après le début de la culture, était beaucoup plus brutale qu'avec St.aureus. Avec une concentration de 2 000 µg/ml de bacitracine, la multiplication reprenait après seize heures, et nous obtenions encore une lyse maximale pour 5 000 µg/ml, puis dégressive pour de plus fortes concentrations.

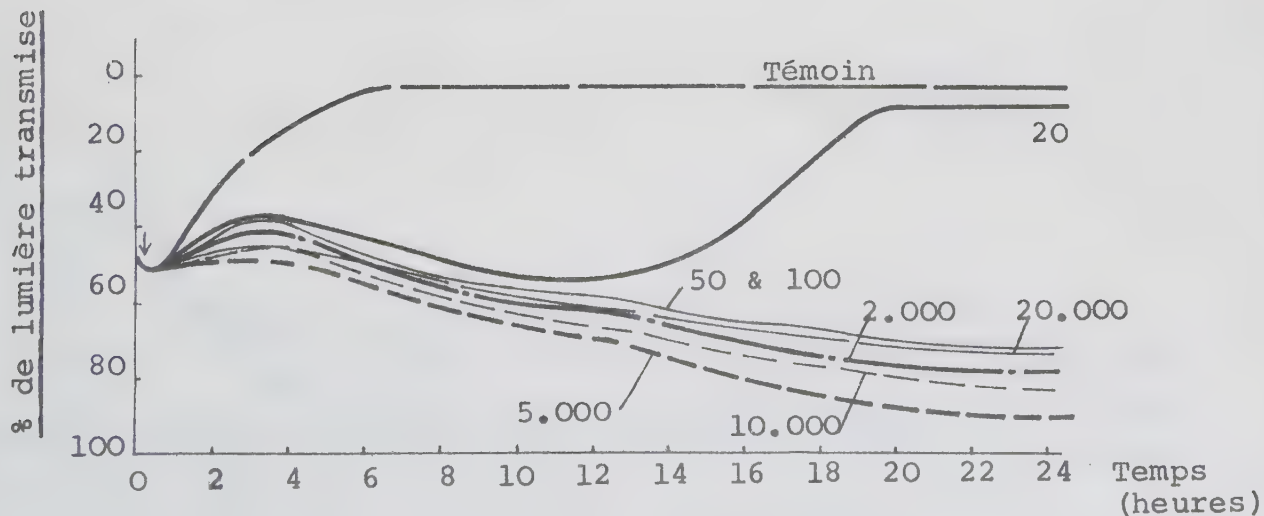
Ce comportement identique de deux souches bactériennes de sensibilité si différentes ne semble pouvoir s'expliquer que par un phénomène physique qu'il reste à déterminer, le pH du milieu étant hors de cause (cf.p.17).

(*) Ce fait a été signalé auparavant par J.BERNARD et S.LAMBIN (11), auxquelles nous empruntons cette technique.

ACTION DE LA BACITRACINE
sur St. aureus âgé de 18 heures

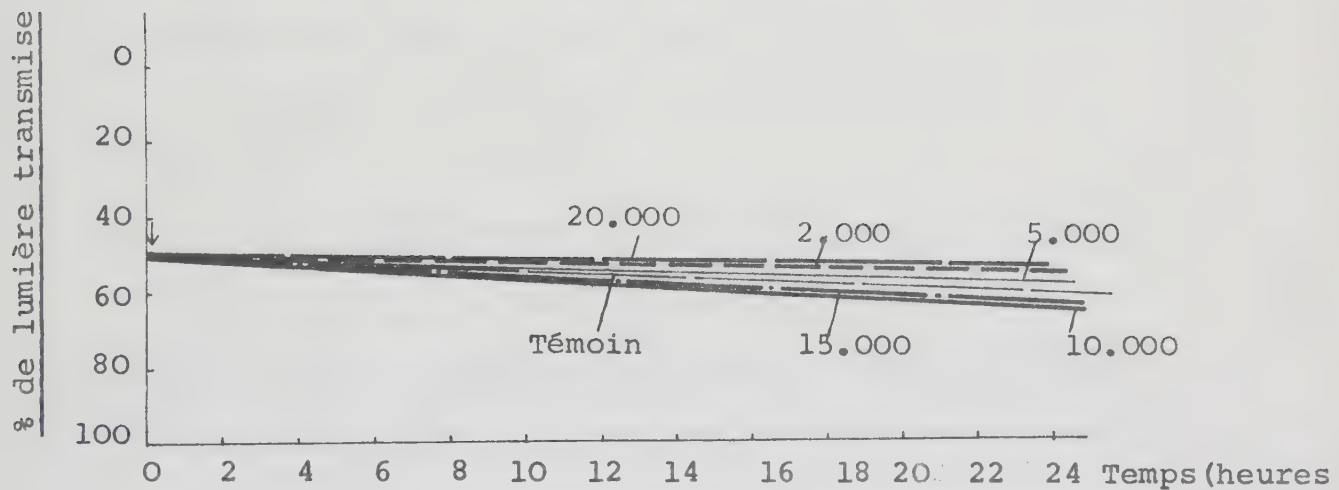


Courbe n° 10 - en eau physiologique

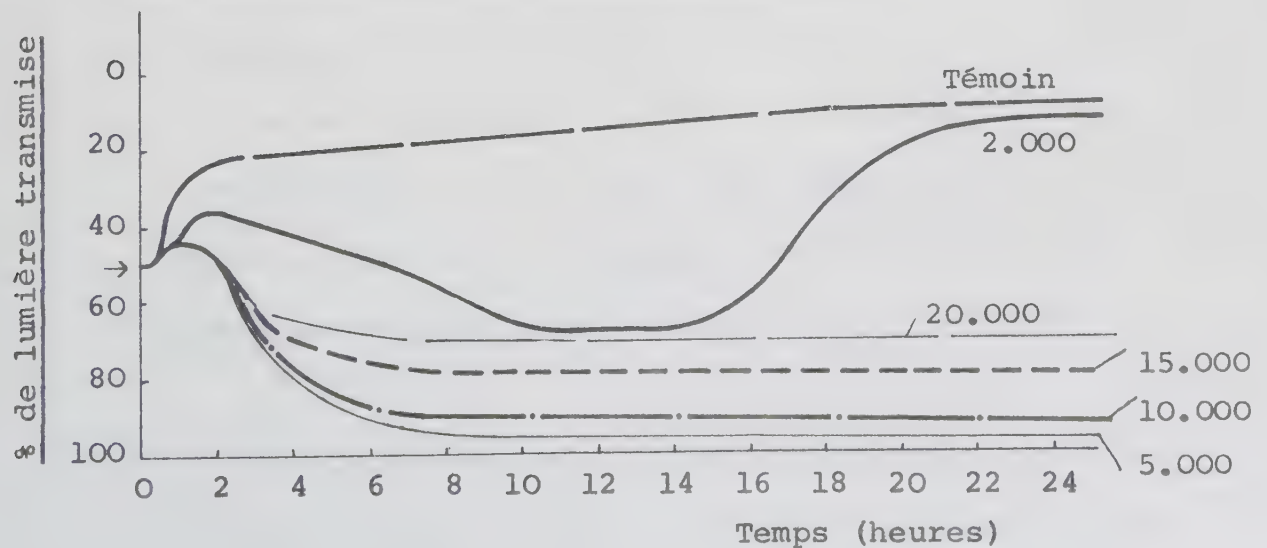


Courbe n° 11 - en bouillon peptoné salé

ACTION DE LA BACITRACINE
sur E. coli âgé de 18 heures



Courbe n° 12 - en eau physiologique



Courbe n° 13 - en bouillon peptoné salé

2) Action de la bacitracine sur des bactéries en phase exponentielle de croissance.

Nous avons repris les mêmes essais en partant d'un bouillon peptoné salé contenant un million de germes par ml, que nous avons laissé incuber dans les cuves du biophotomètre.

Lorsque l'opacité des cultures atteignait une valeur correspondant à 50 % de lumière transmise, c'est-à-dire en pleine phase de multiplication exponentielle, diverses concentrations de l'antibiotique étaient réparties dans les cuves, sous un volume constant de un ml.

Avec St.aureus, (courbe n° 14) pour des concentrations allant de 5 à 15 µg/ml, la multiplication apparente était légèrement ralentie, mais persistait encore durant deux heures; à ce moment, on observait un arrêt ou bien une lyse, dont la durée et l'intensité variaient selon la concentration en essai.

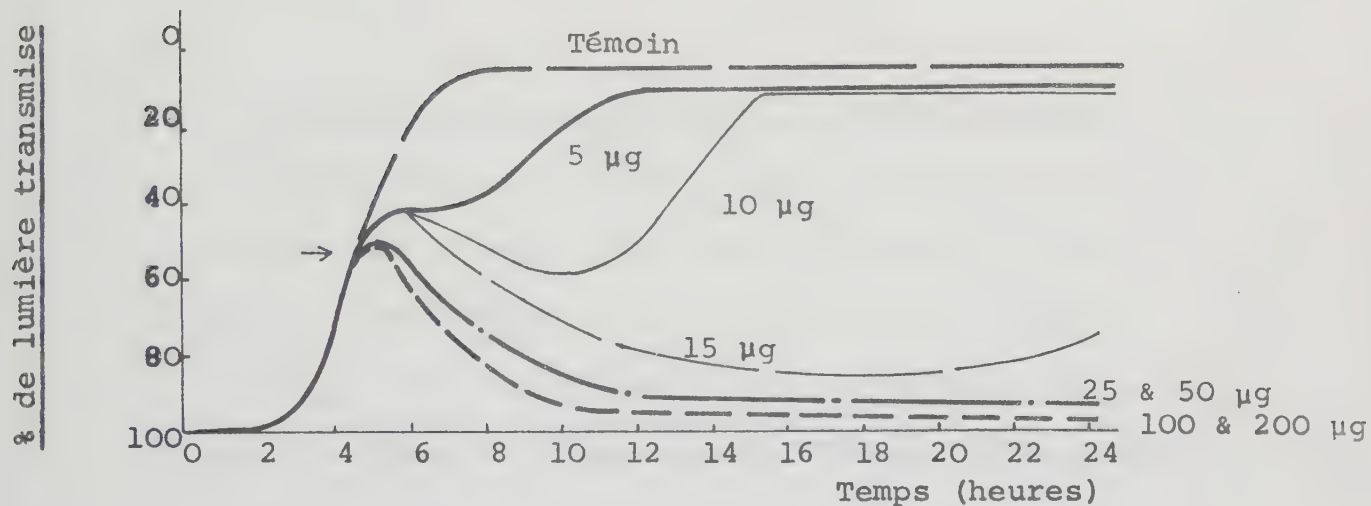
Un arrêt brusque de croissance, suivi d'une lyse intense et irréversible, survenait pour des concentrations de 25 à 200 µg/ml.

Une comparaison de ces résultats avec ceux obtenus sur des bactéries âgées de dix huit heures, nous apprend que l'action lytique de la bacitracine sur St.aureus est plus intense et plus durable sur des bactéries en phase exponentielle de croissance.

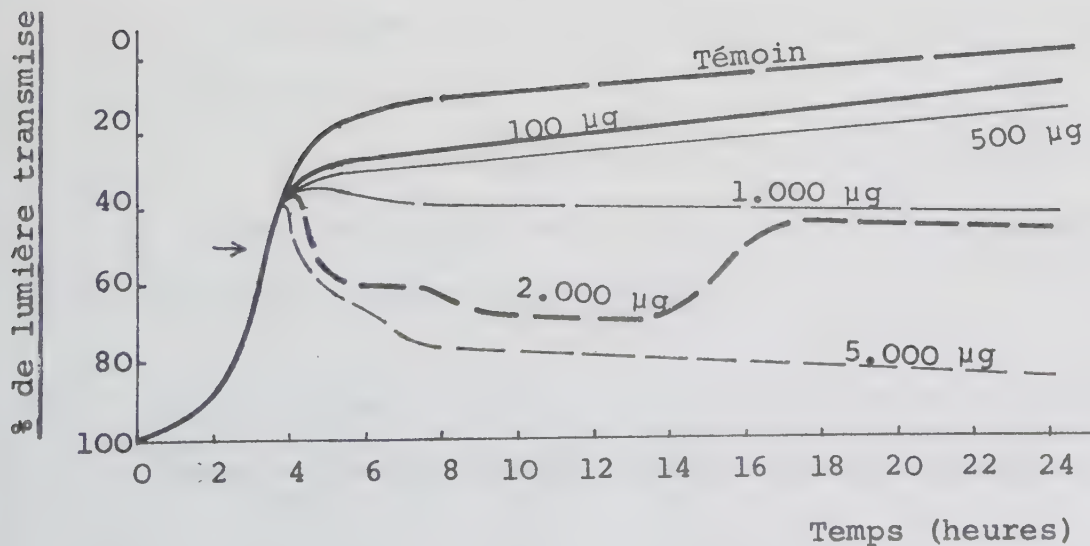
Avec E.coli (courbe n° 15), l'antibiotique ajouté ne produisait aucun effet visible sur la croissance durant la première heure pour

ACTION DE LA BACITRACINE SUR DES BACTERIES

EN PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE



Courbe n° 14 - *Staphylococcus aureus*



Courbe n° 15 - *Escherichia coli*

des concentrations allant jusqu'à 1 000 µg/ml, mais l'opacité maximale n'atteignait jamais celle de la culture témoin, et sa valeur variait en sens inverse des concentrations introduites. Avec 5 000 µg/ml, la lyse était irréversible.

3) Rôle de l'âge des bactéries dans l'induction de la lyse.

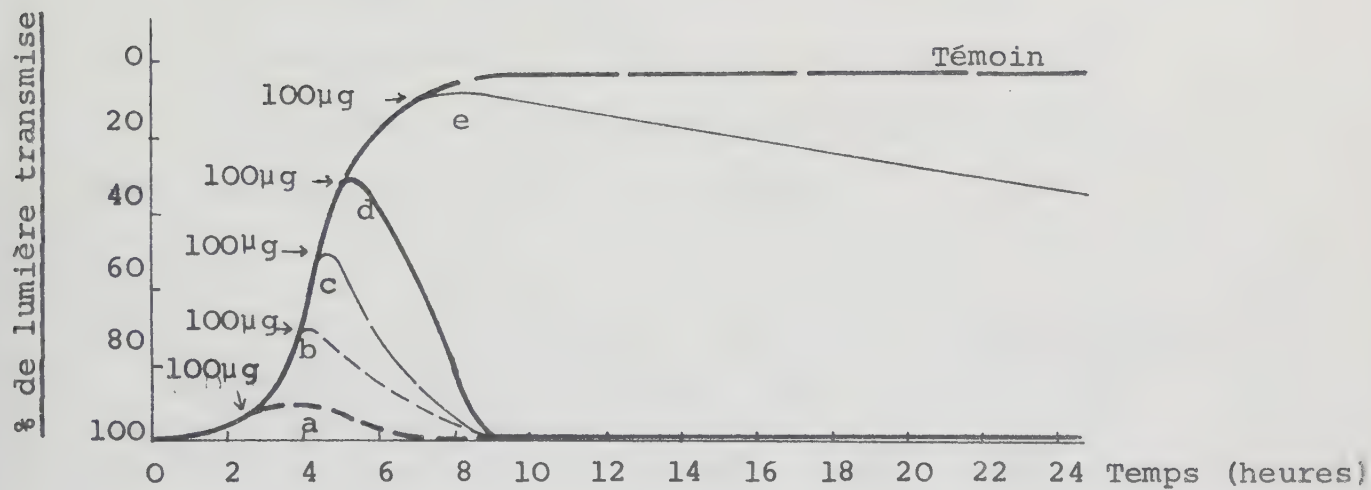
Voulant déterminer avec plus de précision l'influence de l'âge des bactéries sur l'action lytique de la bacitracine, nous avons effectué une nouvelle série d'essais où une même concentration de l'antibiotique (100 µg/ml pour St.aureus, et 5 000 µg/ml pour E.coli) était introduite à des moments différents de la croissance régulièrement échelonnés au long de la courbe enregistrée au biophotomètre.

Pendant toute la phase logarithmique de croissance, l'arrêt de la multiplication de St.aureus (courbe n° 16), en présence de 100 µg/ml de bacitracine, était immédiat, et la lyse qui survenait ensuite était totale.

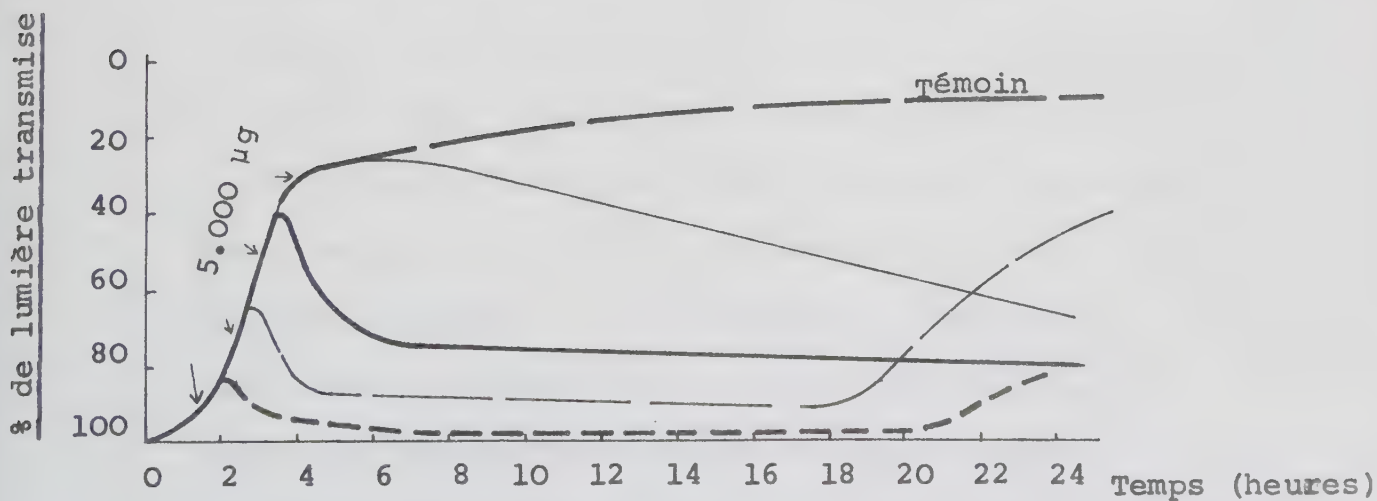
En fin de multiplication, par contre, le milieu de culture ne s'éclaircissait que lentement, et il fallait attendre quarante heures environ pour une lyse totale.

Avec E.coli (courbe n° 17), une concentration de 5 000 µg/ml produisait des modifications différentes dans la croissance :

ROLE DE L'AGE DES BACTERIES
DANS L'ACTION DE LA BACITRACINE



Courbe n° 16 - Staphylococcus aureus



Courbe n° 17 - Escherichia coli

d'une part, l'action lytique de la bacitracine ne s'exerçait qu'après un temps de latence d'environ trente minutes, et, d'autre part, celle-ci n'était pas totale. Lorsque l'antibiotique était ajouté en début d'incubation, la multiplication recommençait après 18 - 20 heures, mais, s'il l'était plus tardivement, l'action était durable. En fin de multiplication, la lyse était très lente à s'établir comme dans le cas de St.aureus.

Nous pouvons conclure, de l'examen de ces différentes courbes, que l'action lytique ne se manifeste que sur des bactéries en prolifération.

En effet, si nous prenons la comparaison des différentes courbes obtenues avec St.aureus, germe sensible et stable dans sa morphologie, nous observons que : pour une concentration de 100 µg/ml de bacitracine agissant sur 500 millions de germes, la lyse est nulle en eau physiologique (courbe n° 10), elle est très faible chez des bactéries âgées de dix huit heures, même si celles-ci sont placées dans un milieu nutritif neuf, car la multiplication ne peut s'effectuer (courbe n° 12), la concentration bactériostatique étant largement dépassée. Par contre, cette même concentration antibiotique, agissant sur le même nombre de germes en phase logarithmique de croissance (courbe 16 d), provoque une lyse immédiate et intense.

A l'égard d'E.coli, (sans vouloir tirer de conclusions trop précises d'études turbidimétriques effectuées sur un germe de morphologie variable), la bacitracine semble également exercer une action lytique lorsque les bactéries sont en cours de multiplication, mais ceci après une période de latence. Ce léger retard d'activité permet paradoxalement une lyse des bactéries âgées transportées en milieu neuf (courbe n° 13).

Ces faits sont le témoignage d'une réelle action au niveau de la paroi bactérienne, mais ceci uniquement au moment de la synthèse de ses constituants, et nous avons ainsi été amenée à tenter d'obtenir, à partir de nos souches bactériennes, des protoplastes sous l'influence de la bacitracine.

II - FORMATION DE PROTOPLASTES BACTERIENS

Pour tenter d'obtenir des protoplastes à partir de nos souches bactériennes, nous avons utilisé la technique de GANANCIA (37), très légèrement modifiée de manière à opérer tout au long de nos essais, dans des conditions aussi proches que possible.

Une suspension bactérienne en milieu hypertonique était préparée en mélangeant, à parties égales, une solution stérile de saccharose à 40 %, additionnée du dixième de son volume d'une solution de sulfate de magnésium à 2,5 %, et une suspension de bactéries en bouillon à double concentration, titrant un milliard de germes par ml.

Les bactéries, âgées de dix huit heures, étaient auparavant récoltées à partir d'un bouillon gélosé, comme il était fait lors des **essais** bactéricides et des études turbidimétriques.

Cette suspension bactérienne était répartie, à raison de 9 ml, dans une série de tubes à essai, et 1 ml d'une solution de bacitracine à diverses concentrations, était enfin ajouté.

Une culture sans antibiotique servait de témoin.

D'autre part, pour s'assurer que les conditions nécessaires à l'obtention de protoplastes étaient bien remplies, dans un des tubes contenant la suspension bactérienne en milieu hypersucré, de la pénicilline était introduite, à raison de 600 U/ml dans le cas d'E.coli, ou 100 U/ml dans le cas de St.aureus.

Des prélèvements, en vue de l'examen morphologique des bactéries au microscope à contraste de phase, étaient effectués d'heure en heure durant six heures, puis après vingt quatre heures d'incubation à l'étuve à 37°C.

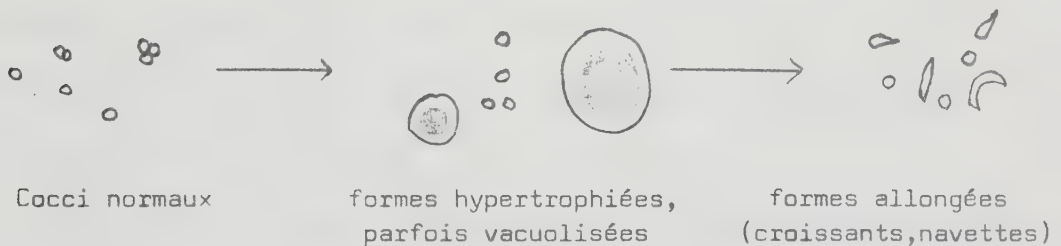
Avec *Staphylococcus aureus*, la forte concentration de saccharose en l'absence de tout antibiotique, ne modifiait pas l'aspect des bactéries : durant les premières heures, les cocci se trouvaient isolés ou associés par deux; après six heures d'incubation et au delà, il y avait formation des grappes caractéristiques.

En présence de pénicilline (100 U/ml), nous n'observions aucune altération des germes jusqu'à la cinquième heure; mais alors, certains cocci devenaient plus réfringents et augmentaient de taille, atteignant trois à quatre fois leur volume normal. Après vingt quatre heures, on retrouvait encore quelques formes hypertrophiées, vacuolisées, et surtout des débris plus ou moins agrégés. Mais il faut remarquer qu'il subsistait toujours quelques formes normales isolées ou associées par deux.

Sous l'action de fortes concentrations de bacitracine (200 et 500 µg/ml), la phase de latence était un peu réduite : dès la quatrième heure, nous observions l'apparition de ces formes réfringentes et hypertrophiées, et souvent, dès ce moment, une vacuole prenait naissance dans ces cocci. Cependant, ces phénomènes n'apparaissaient qu'après six heures pour une concentration de

100 µg/ml, et vingt quatre heures pour 50 µg/ml.

Après vingt quatre heures, pour les fortes concentrations de l'antibiotique, on ne retrouvait plus ce type d'anomalies, mais on constatait la présence de nombreuses petites formes irrégulières, allongées, certaines piriformes, d'autres en croissant ou en navettes, tandis que quelques formes normales subsistaient dans tous les cas.



Peut-on parler de protoplastes de St.aureus induits par la bacitracine?

Nous n'osons l'affirmer : en effet, si les formes hypertrophiées ressemblent beaucoup à celles obtenues sous l'influence de la pénicilline, elles sont, avec la bacitracine, très fugaces, ce qui pourrait s'expliquer par une lyse rapide par action secondaire sur la membrane, mais on ne retrouve pas les débris de membranes sous forme de "fantômes", comme avec la pénicilline dans les cultures âgées. Par contre, les petites formes allongées proviennent sûrement de la transformation de ces formes hypertrophiées, comme

s'il se créait des forces internes actives, tiraillant l'enveloppe cellulaire.

Il est donc possible que la paroi ne soit pas totalement absente chez ces bactéries, mais elle est certainement modifiée.

Les cultures d'Escherichia coli ont été examinées dans les mêmes conditions.

Par sa seule présence, le saccharose provoquait quelques changements : après deux heures d'incubation, un raccourcissement de la taille des bacilles, et après six heures, une diminution de leur mobilité, bien que celle-ci persistât nettement.

En présence de pénicilline (600 U/ml), la formation de protoplastes classiquement décrite, s'effectuait dès la deuxième heure, et la conversion était totale après quatre heures. Après vingt quatre heures, on observait des formes plus ou moins vacuolisées et de nombreux "fantômes".

A la concentration de 1 000 µg/ml, concentration infrabactériostatique, la bacitracine produisait quelques altérations de la morphologie après trois à six heures d'incubation : formes géantes filamenteuses, formes arrondies; mais ces phénomènes étaient transitoires, et la culture était identique au témoin sans antibiotique après vingt quatre heures.

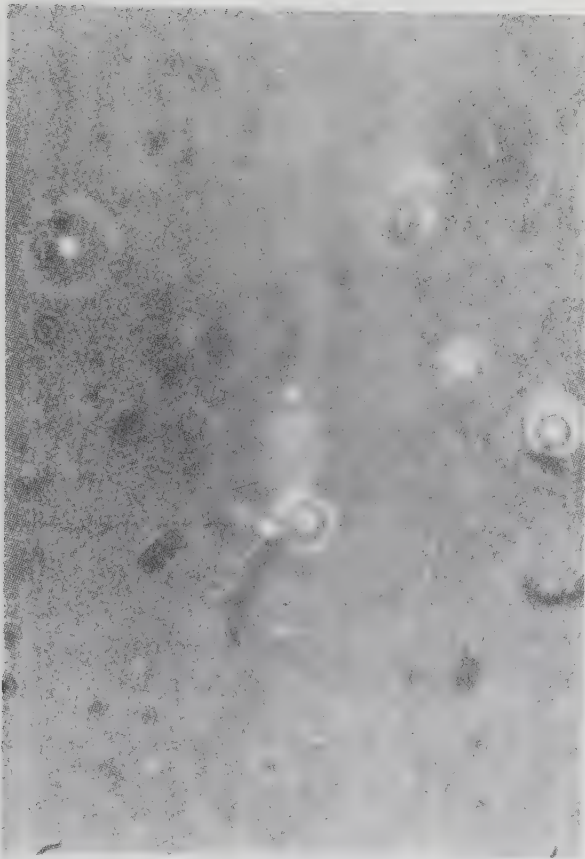
Lorsque la concentration de bacitracine atteignait 10 000 µg/ml,

l'apparition de quelques formes rondes s'accompagnait d'une lyse intense des bactéries, et de la formation d'agrégats mal délimités.

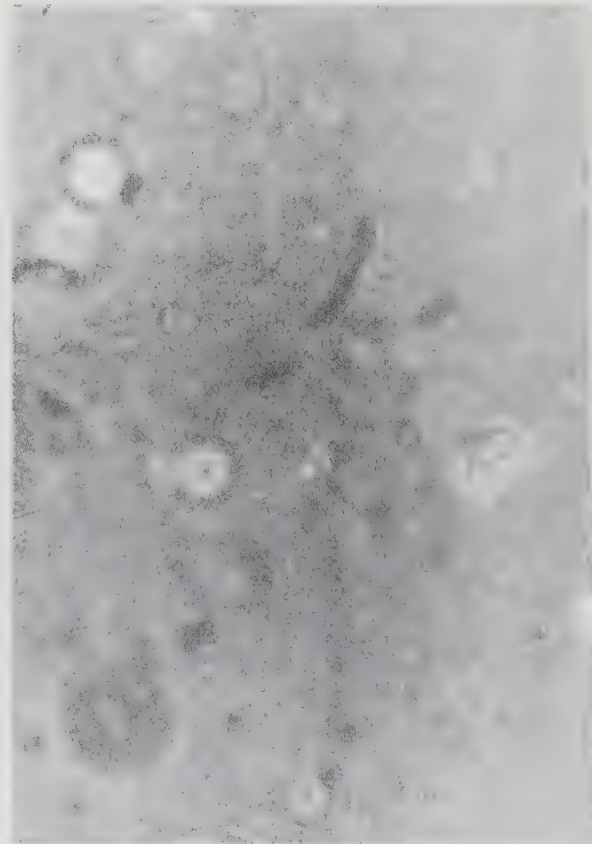
Mais pour des concentrations de 2 000 et de 5 000 µg/ml de bacitracine, après un contact de deux heures, on observait l'apparition de certains bacilles plus réfringents subissant d'actives déformations (excroissances fugaces, dites en "oreilles de lapin"), puis la bactérie finissait par s'immobiliser en une forme sphérique, dont le volume s'accroissait fortement. Des vacuoles paraissaient, généralement excentriques, et dont le développement accentuait encore l'hypertrophie du microorganisme. Après vingt quatre heures, on retrouvait formes vacuolisées et débris de membranes ("fantômes").

Ainsi, dans le cas d'E.coli, la bacitracine se comporte, en milieu hypertonique, exactement comme la pénicilline, induisant la formation de protoplastes.

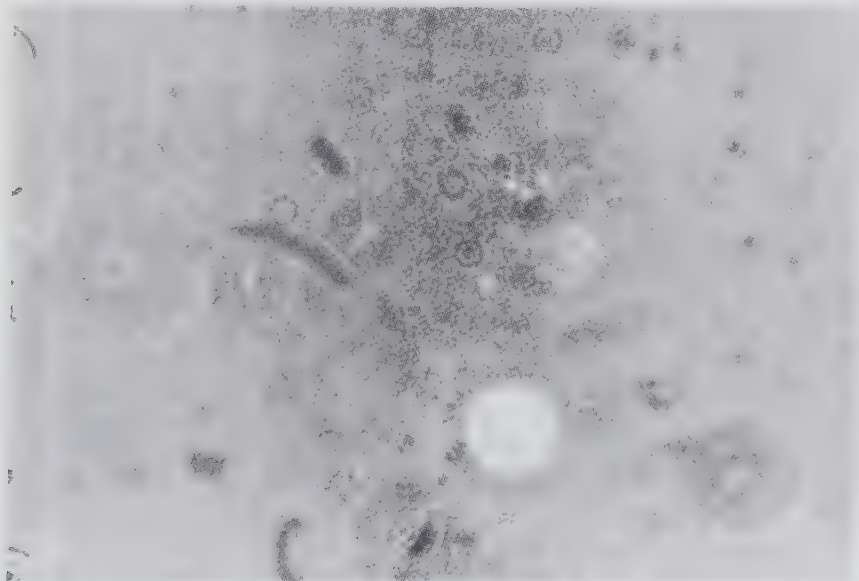
Si nous nous reportons aux courbes de croissance obtenues dans les mêmes conditions de culture (bactéries du même âge ,et en nombre égal, mises en présence de la même concentration de bacitracine), mais sans saccharose, nous remarquons que la lyse était intense pour Escherichia coli (courbe n° 13), après une phase de multiplication, alors que l'effet lytique, pour Staphylococcus aureus (courbe n° 11) débutait dès la mise en contact avec



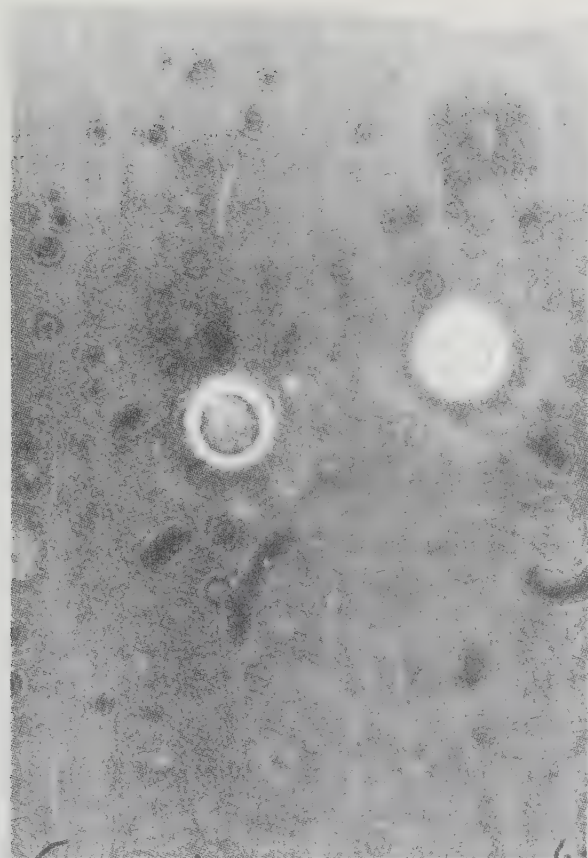
Protoplastes en formation (3ème heure)



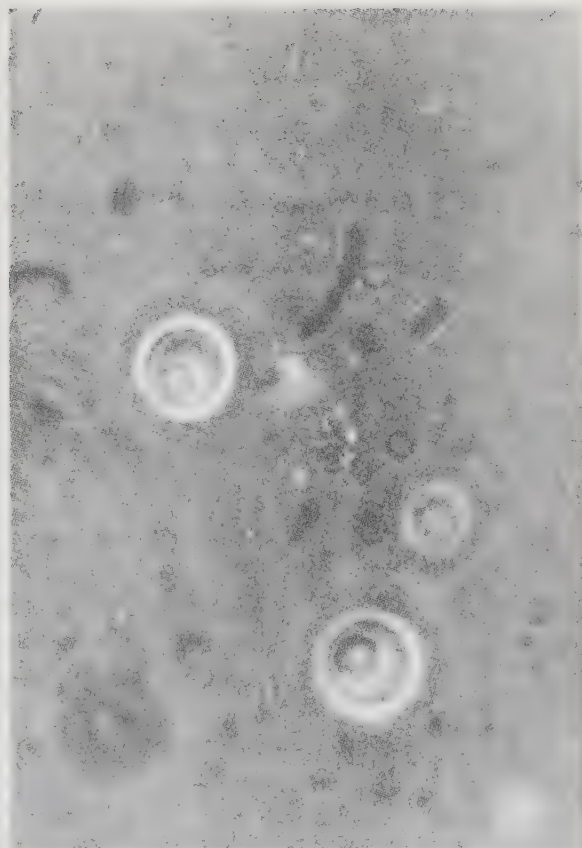
Jeunes protoplastes jumelés (3ème heure)



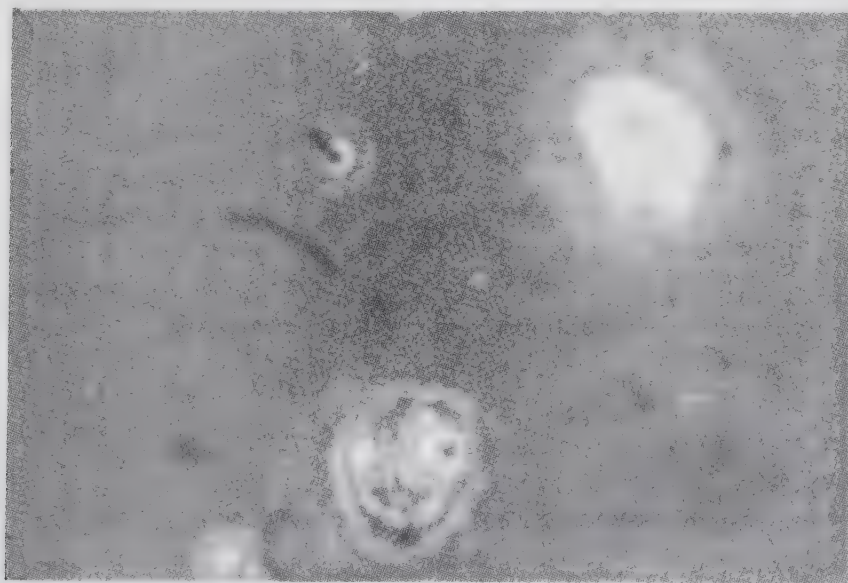
Protoplaste à la 4 ème heure



Protoplastes à la 6ème heure.
(celui de droite va se lyser)



Protoplastes vacuolisés (24ème heure)



"Lap" (24ème heure) vingt quatre heures

l'antibiotique, mais était très progressif.

Ainsi, dans les conditions de nos essais, si la bacitracine inhibe la synthèse des constituants de la paroi, il est normal que les cellule d'E.coli, ayant pris naissance en présence de l'antibiotique, se transforment en protoplastes en milieu hypersucré.

Au contraire, la paroi de St.aureus qui n'a pu se multiplier dans ces mêmes conditions, doit exister, car la bacitracine n'agit pas, comme le ferait le lysozyme par exemple, en lysant des parois déjà formées. Et les formes anormales observées ne témoignent sans doute pas d'une absence totale de paroi, mais seulement de certaines modifications à ce niveau.

D/ ACTION SUR LA RESPIRATION BACTERIENNE

=====

Si l'existence de mitochondries vraies chez les bactéries, est généralement contestée, on admet que les enzymes responsables de la respiration sont localisés au contact de la face interne de la membrane (56),(98), et plus spécialement dans les mésosomes (48),(75). Une lésion éventuelle de la membrane bactérienne par la bacitracine, peut donc, bien que non nécessairement, se répercuter sur la respiration. Cependant, une perturbation de la respiration peut être également due à un trouble au niveau du métabolisme des enzymes (protéines ou cofacteurs) entrant en jeu dans ce phénomène.

Ainsi, nous avons été amenée à rechercher d'éventuelles variations de l'intensité respiratoire des germes en présence de bacitracine, et, dans ce but, nous avons utilisé la technique manométrique de WARBURG, suivant le mode opératoire de BEIGNOT-DEVALMONT, CARRERE et LAMBIN (10).

Mais il fallait d'abord, comme le préconisait PATTE (71), "habituer" les souches au substrat donné, afin que l'induction des enzymes nécessaires à sa dégradation n'entrent pas en ligne

de compte lors des mesures.

Les substrats choisis étaient le succinate de sodium, le pyruvate de sodium et le glucose, et les bactéries étaient "préparées" par une série de trois repiquages préalables en bouillon gélosé additionné de 2 % du substrat à l'étude.

Les bactéries, âgées de dix huit heures, étaient alors récoltées et mises en suspension dans une solution tampon pH = 6,4, dont la composition était la suivante :

phosphate monopotassique..... 5,10 g
phosphate disodique 5,40 g
Eau distillée q.s.p. un litre
(stérilisation 30 minutes à 120°C)

Le pH était choisi comme procurant une intensité maximale de la respiration bactérienne, selon NUNHEIMER (66).

La suspension bactérienne était centrifugée pendant dix minutes à 4 000 tours par minute, et le culot lavé soigneusement dans une nouvelle quantité de solution tampon. Après nouvelle centrifugation et rejet du surnageant, la suspension bactérienne était diluée de manière à obtenir un titre de 10^9 germes par ml.

On obtenait ainsi des bactéries "quiescentes", débarrassées de toute substance nutritive, ce qui avait un double but : d'une part, la multiplication était rendue impossible et n'entrerait pas en ligne de compte dans les résultats, d'autre part, la respiration mesurée ne serait due qu'au seul substrat ajouté

(la respiration endogène était si faible pour les bactéries en essai qu'elle n'était pas mesurable, comme nous avons pu le vérifier).

Les fioles de WARBURG étaient alors remplies de la façon suivante :

- zone centrale : KOH à 20 %..... 0,2 ml
dans lequel plongeait un petit filtre de
2 cm de côté, replié en accordéon
- zone annulaire Tampon pH = 6,4..... 1,4 ml
Solution de substrat à 20 %..... 0,3 ml
Suspension bactérienne à 6×10^9 /ml..... 1 ml
- cupule annexe Solution d'antibiotique (ou eau)
à diverses concentrations..... 0,3 ml

L'agitation était réglée à cent secousses par minutes environ.

On laissait d'abord, durant quinze minutes, la température des fioles s'équilibrer avec celle du bain-marie (+37°C).

Les robinets des manomètres étaient alors fermés; la cupule contenant la solution antibiotique (ou l'eau distillée pour les témoins) était renversée, et les lectures étaient effectuées toutes les trente minutes pendant cinq heures.

Les variations de pression lues sur le manomètre, étaient converties en microlitres d'oxygène consommé, compte tenu des variations de température et de pression extérieures, et du volume individuel de chaque cuve.

Les résultats obtenus étaient transcrits sur des courbes, en portant en abscisses le temps en heures, et en ordonnées le volume d'oxygène consommé en microlitres.

Parallèlement à cet essai, et dans les mêmes conditions, l'opacité des suspensions était mesurée tout au long de l'expérience au biophotomètre de BONET-MAURY, afin de rechercher une lyse éventuelle.

D'autre part, en fin d'expérience, nous avons dénombré les bactéries encore capables de se multiplier. Après dilution convenable, les suspensions bactériennes ayant été, ou non, en contact avec l'antibiotique, étaient ensemencées en surface de bouillons gélosés contenus en boîtes de Pétri. Ces dilutions avaient un double effet : permettre l'obtention de colonies isolées (les concentrations bactériennes étant au départ 2×10^9 bactéries par ml) pour les dénombrer, et porter l'antibiotique à concentration infra-bactériostatique. Après 24 heures d'incubation à 37°C, la numération des colonies était effectuée.

1) Action de la bacitracine sur la respiration de Staphylococcus aureus.

Les concentrations de bacitracine mises en essai ont été très élevées (200 à 10.000 µg/ml) malgré la grande sensibilité de cette espèce bactérienne, mais, pour des concentrations moindres, l'action restait très discrète, et donc difficile à interpréter.

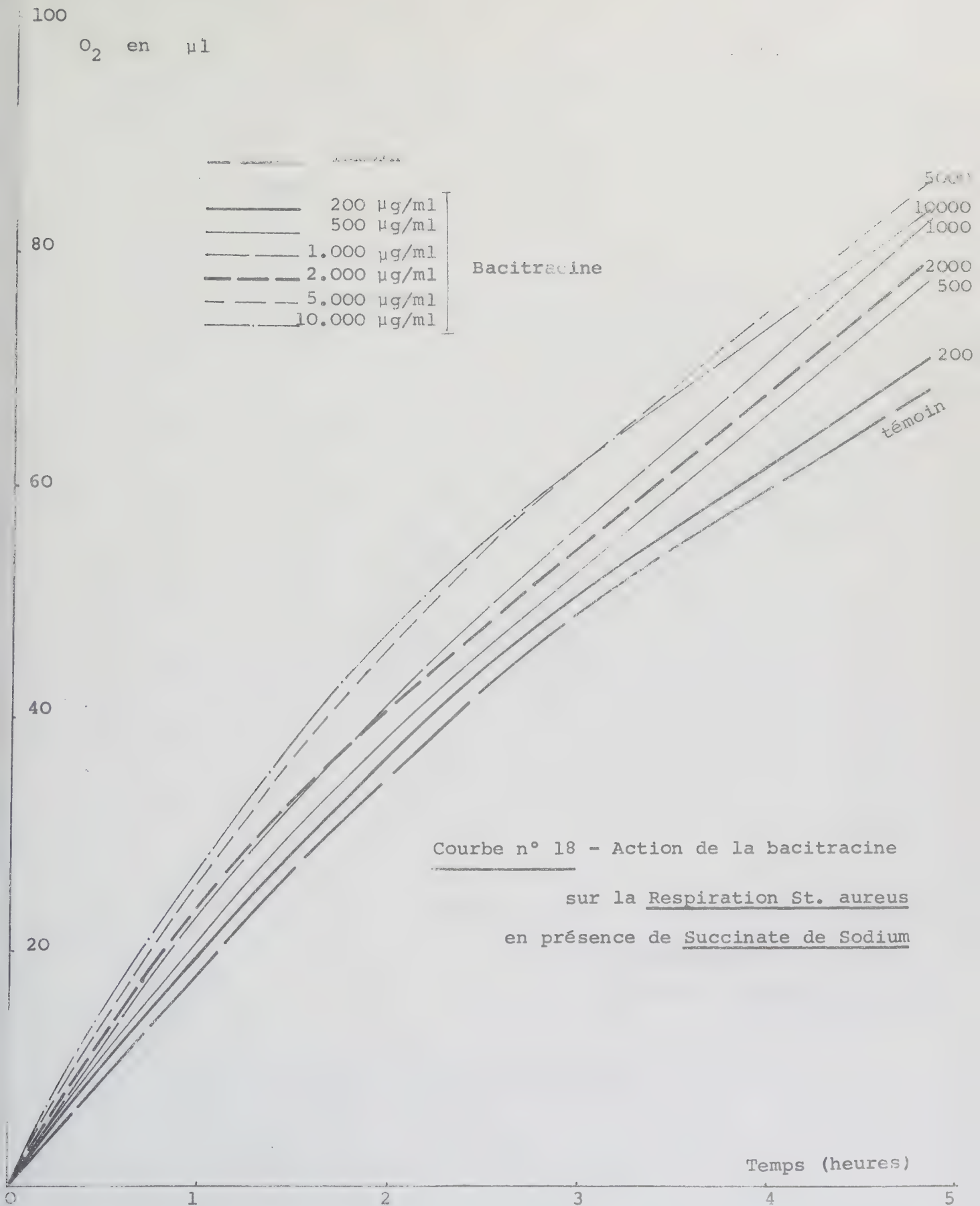
Lorsque le succinate de sodium (courbe n° 18), et le pyruvate de sodium (courbe n° 19) étaient utilisés comme substrats, il se produisait une accélération très nette de la respiration (surtout avec le pyruvate de sodium), et ceci proportionnellement à la concentration de l'antibiotique introduite.

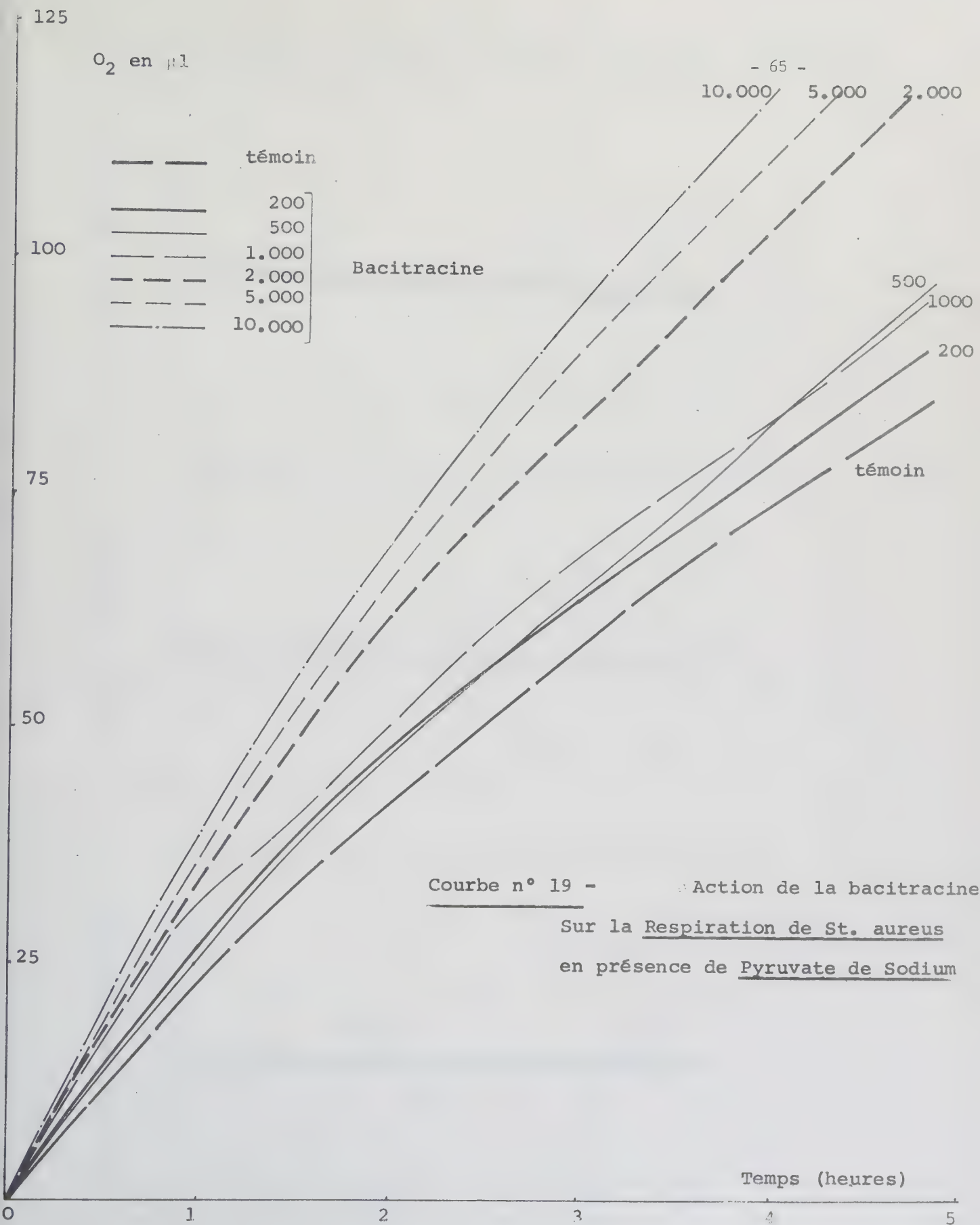
Ce phénomène nous paraissant surprenant, et étant contraire aux résultats généralement obtenus avec d'autres antibiotiques (23), (64), (66), (71), (75), (107), nous avons multiplié nos expériences, mais, dans tous les cas, cette stimulation respiratoire était retrouvée.

Or, l'opacité des suspensions bactériennes restait constante pendant toute la durée de l'expérience (courbes n° 20 et n° 21) : l'hypothèse d'une lyse libérant dans le milieu extérieur les enzymes nécessaires au catabolisme oxydatif des substrats, évitant ainsi le stade de pénétration au travers de la paroi, ne pouvait donc être retenue.

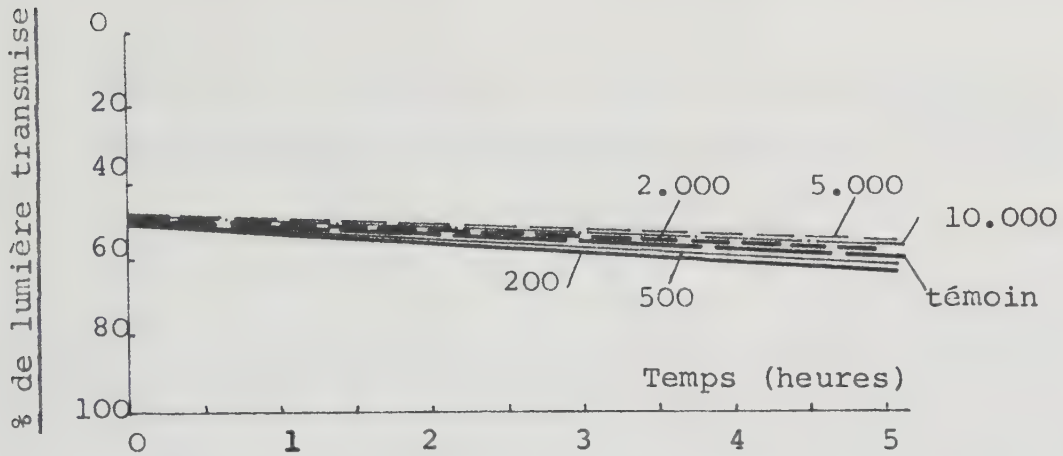
Le nombre de germes capables de proliférer en fin d'expérience a été très irrégulier selon les essais; cependant, en moyenne, il semble que celui-ci varie peu dans ces conditions (tableau n° 2), quelque soit la concentration de bacitracine mise en jeu.

Ce fait peut suggérer que les bactéries, par un phénomène d'autodéfense, accroissent leur activité respiratoire, celle-ci remplissant mal son office d'accumulateur d'énergie.

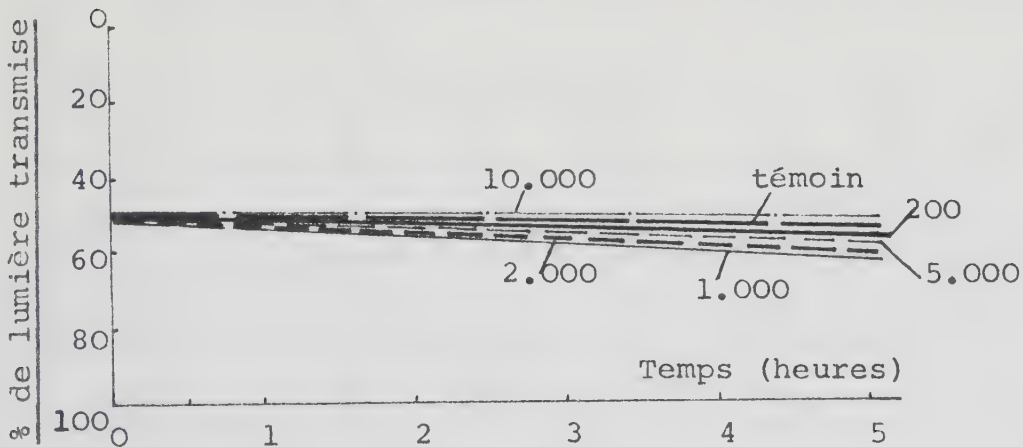




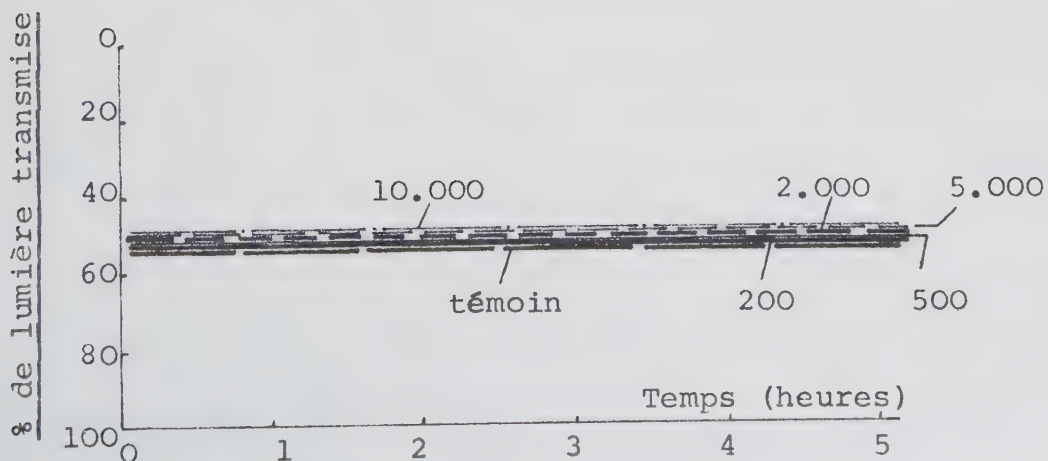
ACTION DE LA BACITRACINE SUR L'OPACITE DES SUSPENSIONS
DE St. aureus EN PRESENCE DE DIVERS SUBSTRATS (Concentration 2%)



Courbe n° 20 - Substrat = Succinate de Sodium



Courbe n° 21 - Substrat = Pyruvate de Sodium



Courbe n° 22 - Substrat = Glucose

Tableau n° 2. Pourcentage de survivants après 5 heures de contact
avec la bacitracine, dans les conditions d'étude de la respiration :
essai avec Staphylococcus aureus.

Concentration de bacitracine µg/ml	S U B S T R A T		
	<u>Succinate de sodium</u>	<u>Pyruvate de sodium</u>	<u>Glucose</u>
0 (Témoin)	100	100	100
500	116	113	69
1.000	103	98	69
2.000	82	81	59
5.000	82	80	54
10.000	101	97	33

250

- 68 -

O₂ en μ l

Témoin

témoin

200

500

1.000

2.000

5.000

10.000

Bacitracine

 μ g/ml

200

2000

500

1000

5.000

10.000

50

Courbe n° 23 - Action de la bacitracine sur la
Respiration de St. aureus
en présence de Glucose

Temps (heures)

0

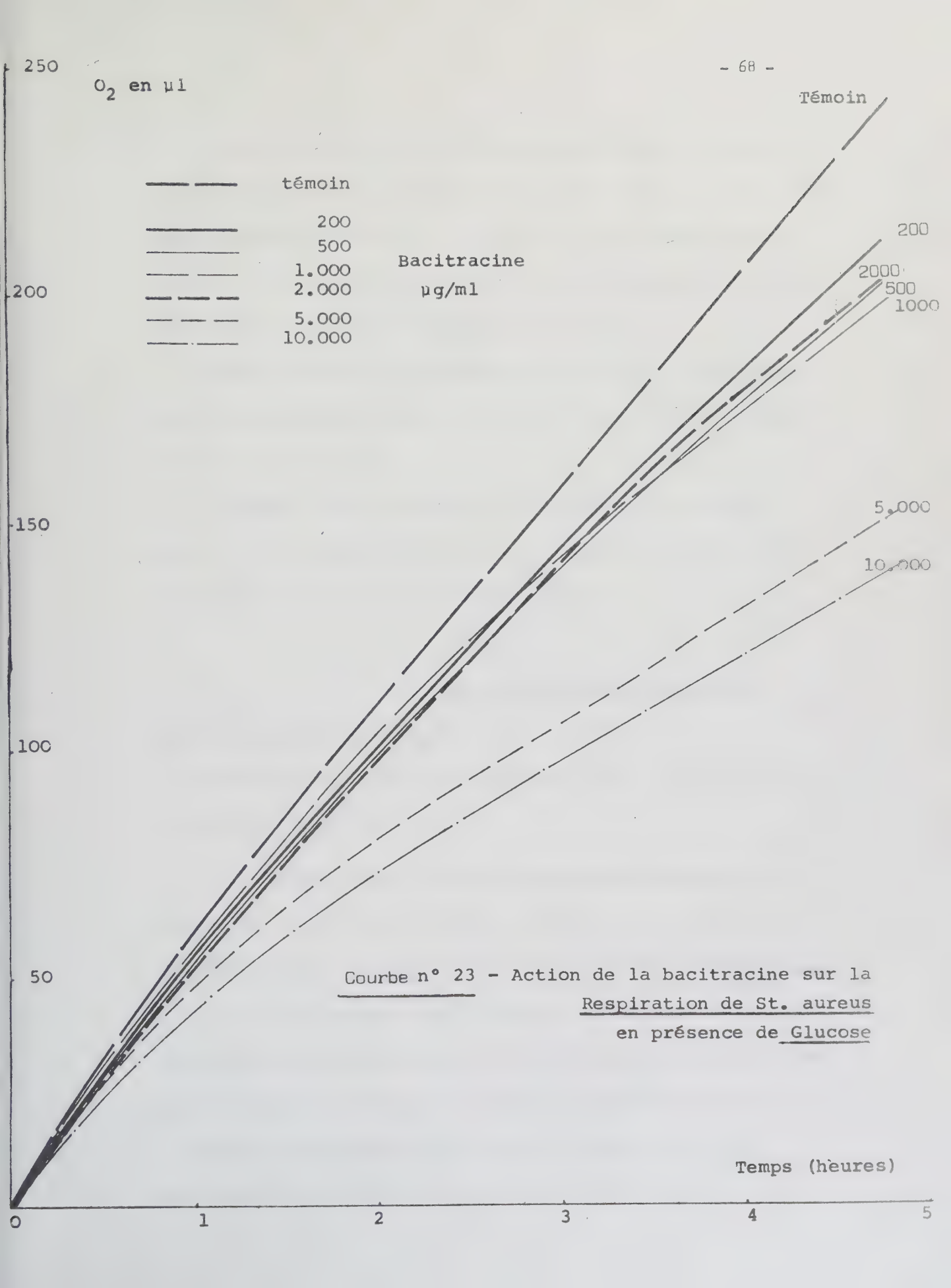
1

2

3

4

5



Lorsque le substrat était le glucose, par contre, si durant la première demi-heure, la respiration restait normale (courbe n° 23), elle diminuait fortement par la suite pour les concentrations de 5 000 et 10 000 µg/ml de bacitracine, et plus discrètement et plus tardivement pour les plus faibles concentrations.

Mais la numération nous apprend (tableau n° 2) qu'une grande partie des bactéries, bien que non lysées (courbe n° 22), étaient tuées dans ces conditions.

Il devient alors très délicat d'interpréter ces résultats, ceux-ci n'étant comparables que pour un nombre de bactéries égal, et ce nombre variant au cours de l'expérience.

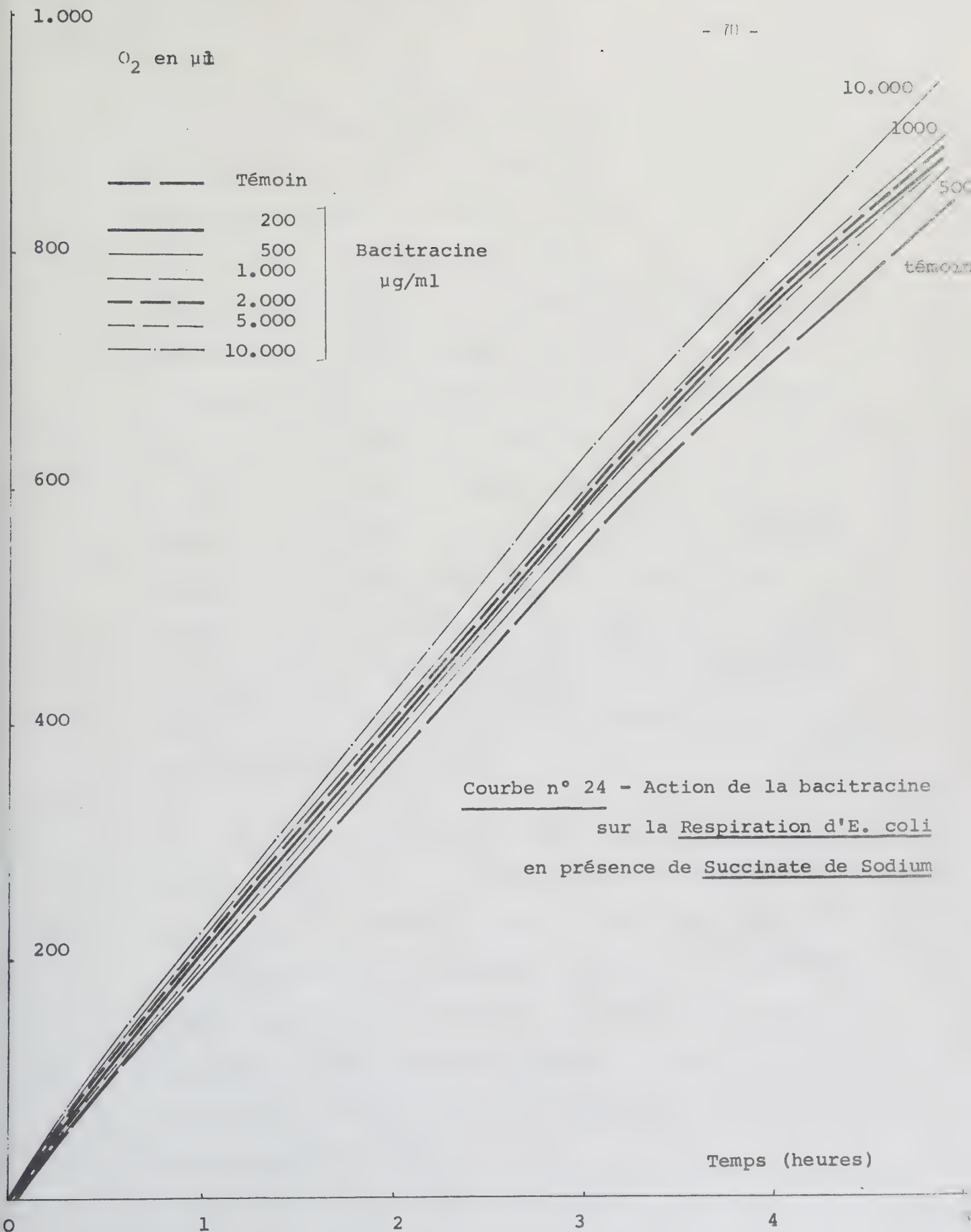
2) Action de la bacitracine sur la respiration d'Escherichia coli.

Les courbes de respiration d'E.coli étaient différentes selon le substrat mis en jeu.

a) Lorsque celui-ci était le succinate de sodium, la respiration était stimulée proportionnellement à la concentration de l'antibiotique (courbe n° 24), comme il en était avec St.aureus.

Il n'y avait pas de lyse (courbe n° 26), et les bactéries conservaient toutes leur pouvoir de prolifération après cinq heures de contact avec la bacitracine, durée de l'expérience (tableau n° 3).

Ceci est parfaitement en accord avec les essais d'activité bactéricide en eau physiologique (courbe n° 9).

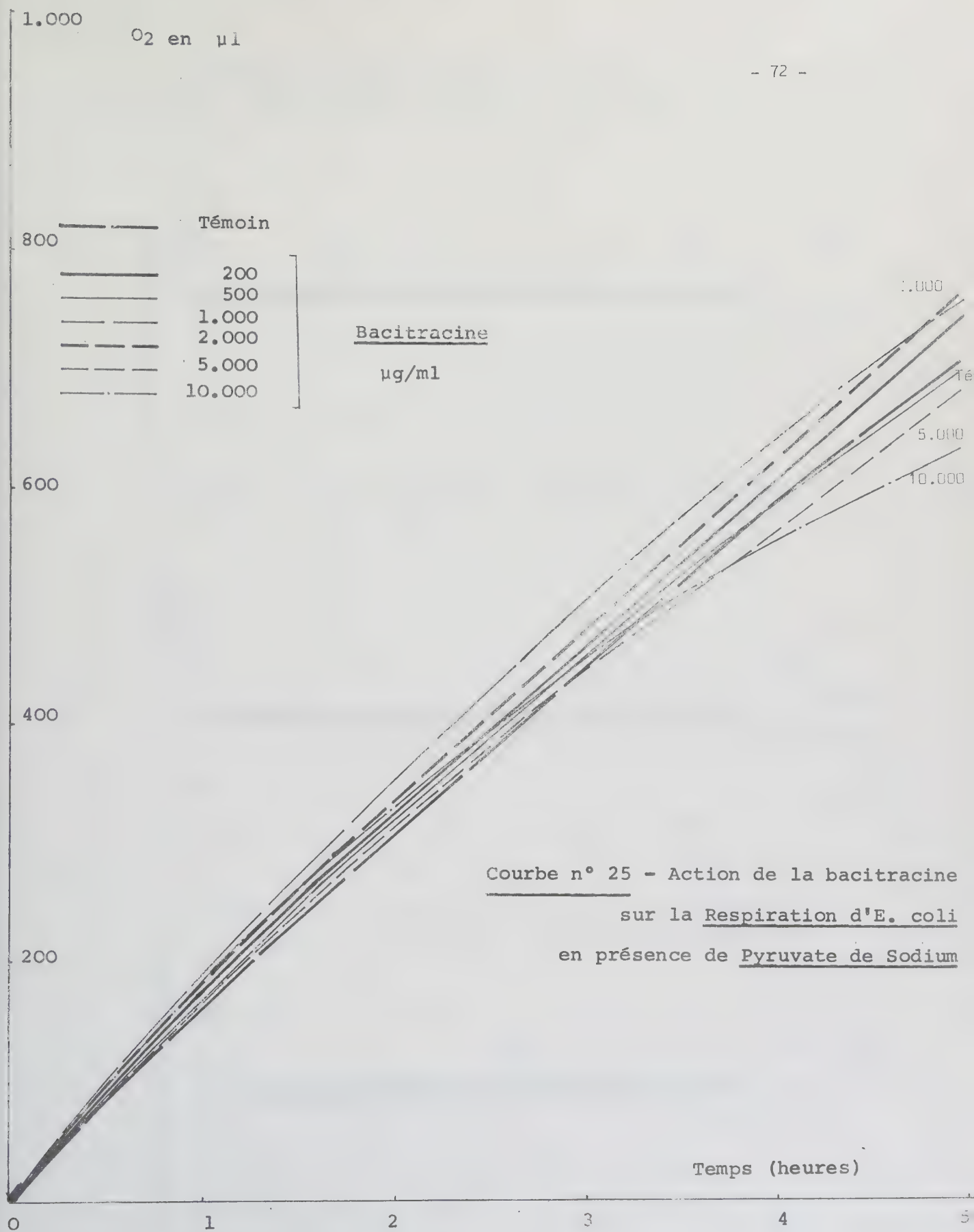


b) Avec le pyruvate de sodium, il y avait encore accélération de la respiration (courbe n° 25), lorsque la concentration de bacitracine était égale ou inférieure à 2 000 µg/ml. La courbe était très proche de celle du témoin pour 5 000 µg/ml, mais avec 10 000 µg/ml, après un temps de stimulation de trois heures, la courbe s'infléchissait légèrement durant les deux dernières heures.

Toutes les suspensions bactériennes, avec ou sans antibiotique, avaient une opacité identique et stable (courbe n° 27).

A la fin de l'essai, la numération des germes survivants (tableau n° 3), ayant été en contact avec 10 000 µg/ml de bacitracine était seulement de 72 % par rapport au témoin, ce qui pourrait expliquer la diminution de la capacité respiratoire. Avec 5 000 µg/ml, 84 % des bactéries conservaient leur pouvoir de prolifération, mais ces chiffres ne sont pas très significatifs, compte tenu des irrégularités selon les essais.

c) En ce qui concerne le glucose (courbe n° 29), durant les deux premières heures, l'addition de bacitracine augmentait considérablement l'absorption d'oxygène, et ceci d'autant plus que la concentration en antibiotique était plus élevée; puis, brusquement, pour une concentration de 10 000 µg/ml, la respiration s'arrêtait complètement. Ce même phénomène se produisait une heure après, avec 5 000 µg/ml, et encore plus tardivement et non totalement avec une concentration de 2 000 µg/ml.



ACTION DE LA BACITRACINE SUR L'OPACITE DES SUSPENSIONS
d'E. coli, EN PRESENCE DE DIVERS SUBSTRATS (concentration 2%)

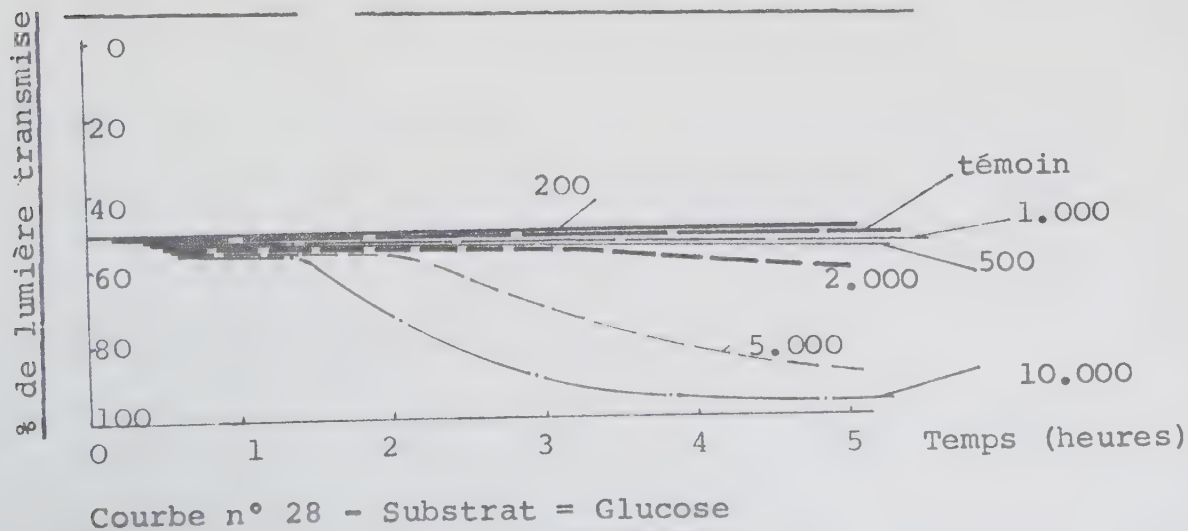
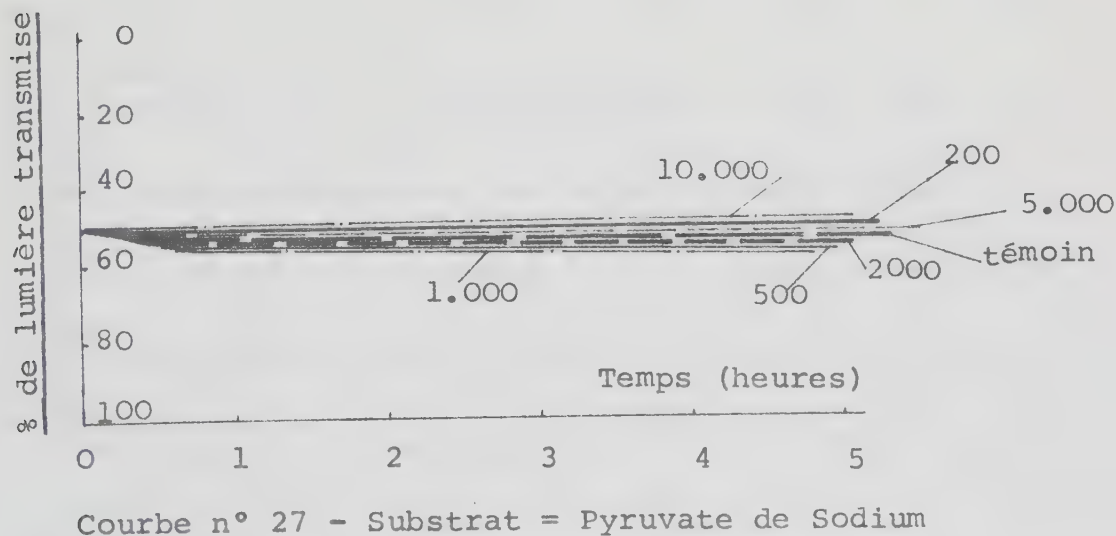
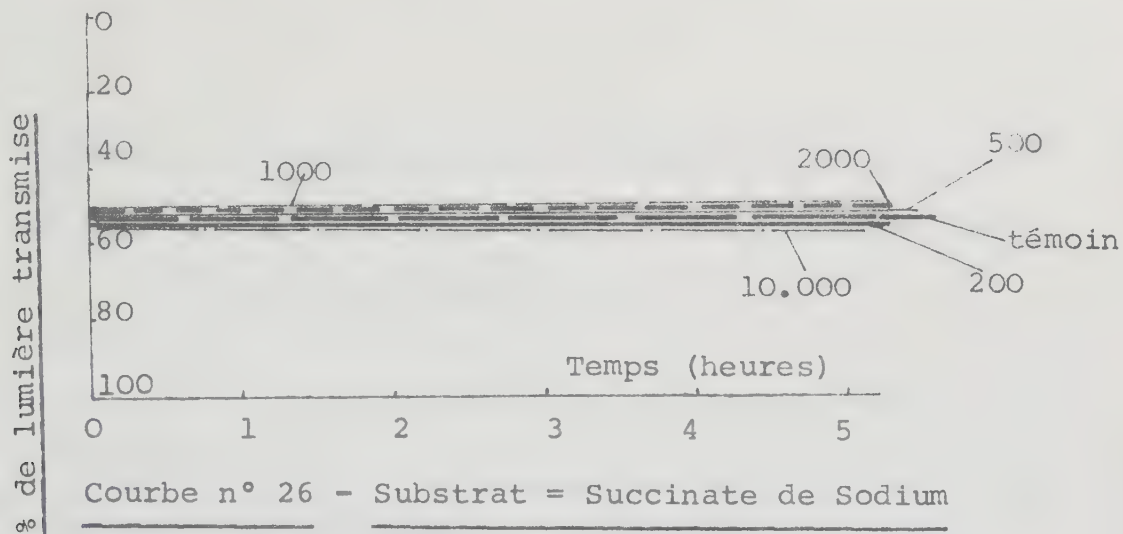


Tableau n° 3. Pourcentage de survivants après cinq heures de contact avec la bacitracine, dans les conditions d'étude de la respiration :
essai avec Escherichia coli.

Concentration de bacitracine µg/ml	S U B S T R A T		
	<u>Succinate de sodium</u>	<u>Pyruvate de sodium</u>	<u>Glucose</u>
0 (témoin)	100	100	100
500	97	104	96
1000	90	114	90
2000	87	97	88
5000	94	84	25
10000	82	72	11

Il faut souligner que ce fait ne peut nullement s'expliquer par l'épuisement du glucose qui était introduit en très gros excès : en effet, chaque fiole contenait 0,3 ml d'une solution à 20 %, soit 60 mg de glucose.

La réaction étant $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6OH_2$,

l'oxydation de 180 µg de glucose va consommer $6 \times 22,4 \mu l (= 134,4 \mu l)$ d'oxygène, et l'oxydation de 60 mg de glucose :

$$\frac{134,4 \times 60\ 000}{180} = 44\ 800 \text{ microlitres d'oxygène}$$

Or, la courbe n° 29 nous montre que la consommation maximale d'oxygène était aux environs de 500 microlitres; une très grande quantité de substrat restait donc disponible.

La cause de cet arrêt respiratoire des bactéries nous est donnée par la courbe d'enregistrement au biophotomètre (courbe n° 28) : en effet, une lyse intense se produisait après un contact de une heure trente avec 10 000 µg/ml de bacitracine, et, plus tard avec 5 000 et 2 000 µg/ml; cette courbe turbidimétrique reproduit parfaitement l'allure de la courbe d'activité respiratoire.

La numération des bactéries survivantes après cinq heures, confirmait ces essais (tableau n° 3) : 11 % des bactéries seulement conservaient leur pouvoir de multiplication, lorsque la concentration en bacitracine était de 10 000 µg/ml, et 25 % lorsque celle-ci était de 5 000 µg/ml.

O₂ en μ l

— — — — — Témoïn

— — — — — 200
 — — — — — 500
 — — — — — 1.000
 — — — — — 2.000
 — — — — — 5.000
 — — — — — 10.000

Bacitracine
 μ g/ml

1.000
 500
 200

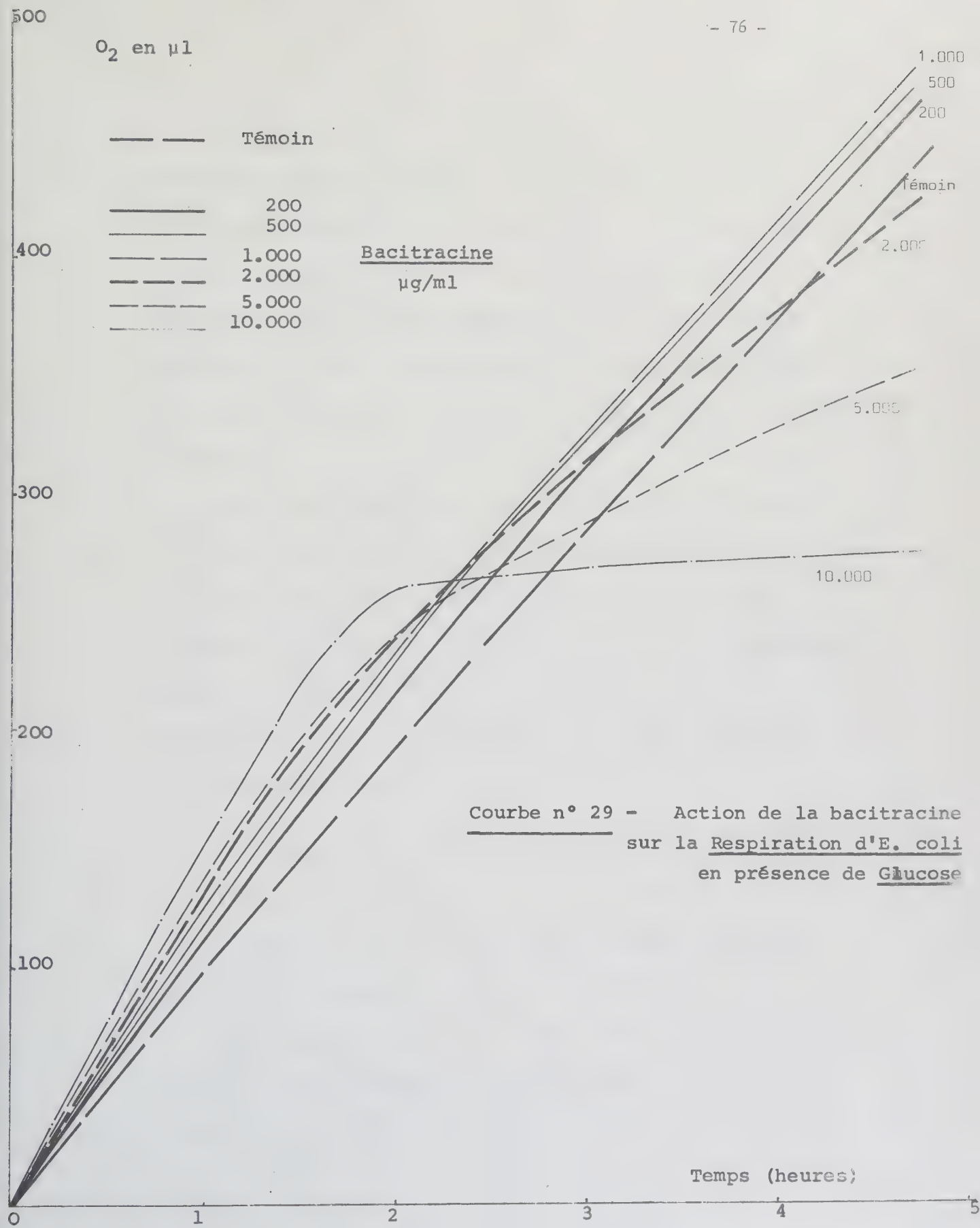
Témoïn
 2.000

5.000

10.000

Courbe n° 29 - Action de la bacitracine
 sur la Respiration d'E. coli
 en présence de Glucose

Temps (heures)



Si la bactériolyse permet de comprendre l'inhibition de la respiration d'Escherichia coli, cette lyse elle-même est plus difficilement explicable, car, au cours de nos expériences, nous ne l'avons rencontrée que lorsque la bacitracine agissait sur des bactéries en état de multiplication, ce qui n'est pas le cas (se rapporter à la courbe d'enregistrement du biophotomètre n° 28, où nous voyons que la suspension bactérienne témoin n'augmente nullement d'opacité).

On peut alors supposer que la seule présence du glucose peut modifier l'action de la bacitracine, lui conférant, dans ces conditions, un certain pouvoir bactéricide. Rappelons que nous avons déjà trouvé ce phénomène lors de l'oxydation du glucose par Staphylococcus aureus, à la lyse près (mais dans tous les cas observés, la lyse était toujours plus lente à se manifester, et moins intense avec cette espèce bactérienne).

Pour comprendre ce phénomène, nous avons cherché à savoir si la concentration en glucose, ou le fait de repiquer plusieurs fois la souche sur milieu glucosé avant l'expérience, modifiait la réponse des bactéries à l'action de la bacitracine.

Aussi avons-nous réalisé deux séries d'essai : l'un sur des bactéries "neuves" entretenues sur milieu gélosé ordinaire, et l'autre sur des bactéries "préparées" ayant cultivé plusieurs fois

sur bouillon gélosé glucosé à 2 % avant l'essai (conditions de l'étude précédente).

Ces bactéries étaient mises en suspension en solution tampon, puis centrifugées et lavées à nouveau. Après une dernière centrifugation, on ajoutait la solution tampon de manière à obtenir un titre final de un milliard de germes par ml. A cette suspension, était ajoutée de la bacitracine à concentration unique (10 000 µg/ml).

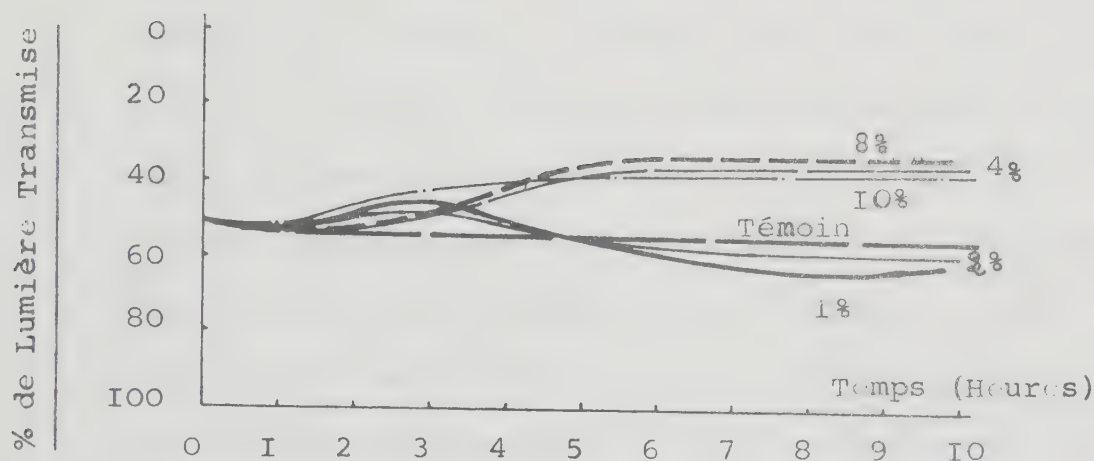
On répartissait alors dans les cuves de biophotomètre, contenant du glucose à concentrations variées (1, 2, 4, 8, et 10 %, ainsi qu'une cuve sans glucose servant de témoin). L'opacité de ces suspensions était alors enregistrée en continu pendant dix heures (courbes n° 30 et 31).

En l'absence de glucose, l'opacité des suspensions témoins, que la souche ait été, ou non, précédemment en contact avec du glucose, demeurait constante.

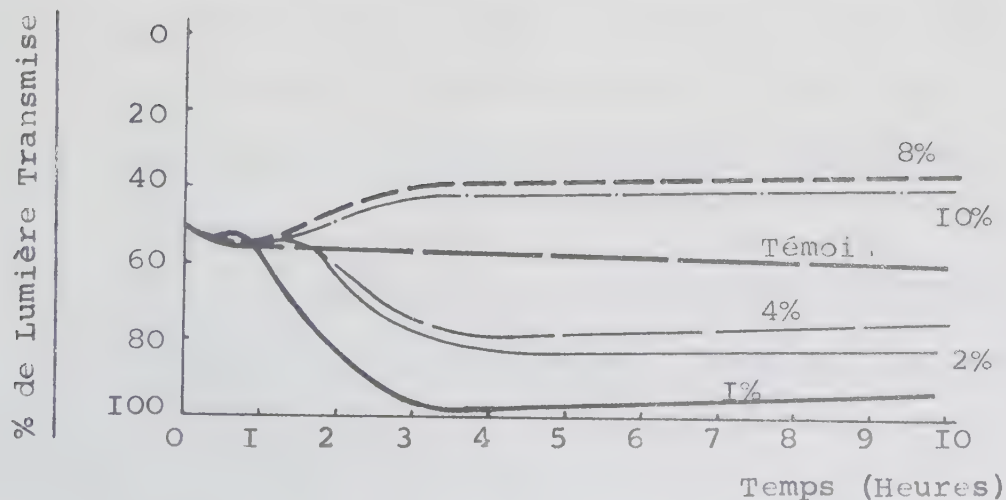
Pour les faibles concentrations de sucre, le milieu s'éclaircissait, mais ce phénomène était faible et tardif (après cinq heures), si les bactéries n'avaient pas été "préparées" auparavant, mais très intense et précoce (après une heure) pour celles ayant cultivé sur milieu glucosé. Cette lyse était inversement proportionnelle à la quantité de glucose contenue dans le milieu (rappelons que la concentration de 2 % était celle utilisée précédemment dans les mesures de respiration).

Effet du glucose sur des suspensions d'Escherichia Coli

en solution tampon (pH=6,4) additionné de 10.000 µg/ml de Bacitracine



Courbe n° 30 - Escherichia Coli ayant cultivé sur bouillon gélosé .



Courbe n° 31 - Escherichia Coli ayant cultivé sur bouillon gélosé glucosé.

Lorsque la concentration en glucose atteignait 8 et 10 %, il y avait, au contraire, un accroissement de l'opacité des suspensions (également avec 4 % pour les bactéries "neuves"), et de façon assez semblable, que les bactéries aient cultivé, ou non, précédemment sur glucose. Il ne faudrait cependant pas attribuer cette augmentation de turbidité à une multiplication bactérienne, difficile à admettre, vu la forte quantité de bacitracine introduite dans le milieu. Celle-ci est due à la présence de formes géantes très anormales, comme nous avons pu le vérifier à l'examen microscopique. Ces perturbations de morphologie expliquent également la petite augmentation d'opacité observée en début d'expérience pour les plus faibles concentrations de sucre (A noter que l'aspect des bactéries n'était nullement modifié lorsque le substrat était le succinate ou le pyruvate de sodium).

Il faut rapprocher ce fait des résultats précédemment obtenus lors de la formation de protoplastes par la bacitracine en milieu saccharosé à 40 % : lorsque la concentration antibiotique était de 10 000 µg/ml, il y avait apparition de formes rondes, et aussi une lyse intense conduisant à la formation d'agrégats mal délimités.

Le glucose jouerait donc un double rôle contradictoire : d'une part, à forte concentration, il protégerait les bactéries

de la lyse, et d'autre part, sa seule présence permettant aux microorganismes de continuer certaines synthèses, celles-ci deviendraient vulnérables à l'action lytique de la bacitracine, ce dernier fait expliquant la sensibilité particulière des bactéries "préparées".

Ainsi, on peut penser que les formes géantes observées en milieu glucosé sont des bactéries incapables de se multiplier, mais en grande activité physiologique, et que, dans ces conditions, l'action lytique de la bacitracine peut se manifester. Un examen de ces bactéries au microscope électronique pourrait sans doute permettre de vérifier ou d'infirmer cette hypothèse.

Au cours de nos essais, à nombre égal, les bactéries (Staphylococcus aureus et Escherichia coli) à l'état de repos du point de vue de la multiplication, et subissant l'action de la bacitracine, ont vu leur respiration stimulée, et cette intensification était proportionnelle à la concentration de l'antibiotique mise en jeu. Ce phénomène suggère qu'il y a un certain gâchis des substrats, contraignant les bactéries à en brûler de plus en plus : l'oxydation des substances carbonées conduisant généralement à la mise en réserve, sous forme d'A.T.P., de l'énergie nécessaire pour effectuer d'autres synthèses, ne remplirait plus son office. La bacitracine agirait, peut-être, comme agent découplant de la phosphorylation.

Ceci n'est, bien sûr, encoer qu'une hypothèse, mais nous nous proposons d'en faire l'étude dans un prochain travail.

E/ ACTION SUR LES ACIDES NUCLEIQUES BACTERIENS

=====

Après avoir étudié l'action de la bacitracine au niveau de la paroi bactérienne, et les modifications qu'elle occasionne au cours de la respiration, il nous a paru essentiel de chercher à savoir si l'origine des dommages causés par cet antibiotique était une atteinte plus profonde : diminution du taux des acides ribonucléiques ou des acides désoxyribonucléiques.

Ainsi, nous avons cherché à doser l'A.D.N. et l'A.R.N. des bactéries ayant été soumises à l'action de la bacitracine, comparativement à des germes témoins non traités.

I- LA TECHNIQUE

La technique d'extraction des acides nucléiques que nous avons adoptée, était celle de SCHNEIDER (78), modifiée par WISSEMAN (106) : hydrolyse simultanée de l'A.D.N. et de l'A.R.N. par l'acide perchlorique 0,5 N à chaud.

Le dosage des acides nucléiques était ensuite effectué par les réactions colorées données par les pentoses : méthode de DISCHE (26) modifiée par BURTON (17) pour l'A.D.N., et méthode de BIAL (13) modifiée par MOULE (62) pour l'A.R.N..

1) Protocole expérimental

a) Préparation des échantillons.

L'antibiotique était ajouté à des cultures en phase de multiplication exponentielle. Pour les obtenir, une culture s'étant développée en bouillon peptoné salé depuis dix huit heures, était, le matin de l'essai, diluée au 1/20ème dans du bouillon neuf, et mise à incuber dans un bain-marie à 37°C, tout en étant soumise à une agitation continue (agitateur thermostatique ERAL, type LAPIERRE).

Après deux heures pour Escherichia coli, et deux heures lrente pour Staphylococcus aureus, les bactéries étaient recueillies après centrifugation et lavées dans une solution tampon phosphate (pH = 7,0). Après une nouvelle centrifugation, les bactéries étaient remises en suspension dans du bouillon neuf (ou en solution tampon dans certains essais), en ajustant la teneur en germes à un milliard par ml (appréciation à l'électrophotomètre de MEUNIER).

Des portions aliquotes étaient alors réparties dans des fioles d'ERLENMEYER, et à ce moment, appelé temps zéro, la bacitracine était ajoutée à des concentrations variables allant de zéro (bactéries témoins) à 10 000 µg/ml.

Toutes les fioles étaient alors soumises à agitation dans un bain-marie à 37°C, durant trois heures.

b) Extraction des acides nucléiques.

Dès addition de l'antibiotique (temps zéro), et après le temps de contact désiré, des prélèvements de 30 ml étaient effectués dans chacune des fioles.

En premier lieu, nous cherchions à apprécier le nombre de germes présents par ml (électrophotomètre de Meunier), afin de pouvoir rapporter la quantité d'acides nucléiques dosés dans l'échantillon à une bactérie.

Les germes étaient ensuite débarrassés de tous les sucres et nucléotides solubles dans l'eau par une centrifugation suivie d'un lavage en solution tampon. Après une nouvelle centrifugation, les bactéries étaient soumises pendant vingt minutes à l'action de 10 ml d'acide perchlorique 0,5N à froid (+ 4°C), en vue d'éliminer les substances acidosolubles. (Pour cette phase d'extraction, tout le matériel utilisé ainsi que le flacon contenant l'acide perchlorique étaient préalablement refroidis afin d'éviter toute perte d'acides nucléiques).

On centrifugeait ensuite dans une centrifugeuse refroidie, et le surnageant était rejeté. Le culot était repris par 5 ml (mesurés très exactement) d'acide perchlorique 0,5N, et porté pendant vingt cinq minutes à 70°C, dans le but de solubiliser les acides nucléiques, puis une nouvelle centrifugation permettait d'éliminer les protéines insolubles.

c) Dosage de l'A.D.N.

Deux prises d'essai de chaque échantillon servaient alors au dosage de l'A.D.N. : l'une de 1,5 ml et l'autre de 0,75 ml complétée à 1,5 ml par de l'acide perchlorique 0,5N.

Un volume égal de réactif à la diphenylamine était ajouté à chaque prélèvement.

La formule du réactif était la suivante :

Diphenylamine Merck.....	1,5 g
Acide acétique.....	100 ml
Acide sulfurique concentré.....	1,5 ml

A 100 ml du réactif conservé à l'obscurité, était additionné au moment de l'emploi, pour le rendre plus sensible, 0,50 ml d'acétaldéhyde aqueux à 16 mg/ml.

Une gamme étalon allant de zéro à cent µg/ml d'A.D.N. était préparée parallèlement de la même manière.

Tous les tubes (étalon et dosage) étaient portés au bain-marie à 70°C pendant vingt cinq minutes, puis brusquement refroidis; la lumière transmise par les solutions étaient alors mesurées au photocolorimètre LUMETRON à 600 mµ.

d) Dosage de l'A.R.N.

Sur les mêmes échantillons, des prélèvements de 0,2 ml et 0,5 ml étaient effectués en vue du dosage de l'A.R.N.

Après avoir complété à 2 ml avec de l'acide perchlorique 0,5N, le réactif de BIAL - MOULE était ajouté à volume égal.

Ce réactif était préparé extemporanément par dissolution de 5 mg d'orcinol Merck par ml d'acide chlorhydrique concentré ($d = 1,119$) contenant 7 mg % de $\text{Cl}_2\text{Cu}, 2\text{OH}_2$ Merck.

Une gamme étalon d'A.R.N., allant de zéro à 100 $\mu\text{g/ml}$ était préparée de la même façon.

Après un passage de vingt minutes au bain-marie bouillant, et refroidissement rapide, la lumière transmise par les solutions était mesurée à 665 $\text{m}\mu$.

e) Lecture des résultats.

Les courbes étalons d'A.D.N. et d'A.R.N. étaient tracées, en portant en abscisses les quantités d'acides nucléiques, et en ordonnées la valeur de la lumière transmise correspondante. Puis, en portant sur les courbes étalons la valeur des lumières transmises par les échantillons, on en déduisait leur teneur en acides nucléiques.

2) Critique de la technique

Dans un premier temps, nous avons voulu nous assurer de la validité de la technique dans notre cas particulier : efficacité de l'extraction et spécificité des dosages sans interférence de la bacitracine.

a) Non interférence de la bacitracine .

Notons dès maintenant qu'au temps zéro (dès l'addition de l'antibiotique), la teneur en acides nucléiques de la suspension

témoin et des suspensions contenant de la bacitracine, était identique. Cela signifie que l'antibiotique ne perturbe pas les dosages, et nous poserons, par définition, cette teneur au temps zéro comme égale à cent.

b) Efficacité de l'extraction.

Ayant eu quelques difficultés, avant d'adopter cette méthode, à bien extraire les acides nucléiques, nous avons voulu comparer les résultats obtenus par cette technique sur les bactéries témoins, avec ceux précédemment trouvés par d'autres chercheurs.

LEMOIGNE, DELAPORTE et CROSSON (57) ont montré que l'A.R.N., chez Escherichia coli, constituait 10 à 20 % du poids sec de la bactérie, selon l'âge, avec une augmentation pour les cellules jeunes, ce qui correspond à $1 \text{ à } 2 \times 10^{-7}$ µg par bactérie.

Ces auteurs ont également mis en évidence que l'A.D.N., chez ce même microorganisme, représentait 3 % du poids sec, soit 3×10^{-8} µg par bactérie.

La moyenne que nous avons obtenue, après seize dosages effectués sur E.coli en pleine phase de multiplication était de :

$$\text{A.R.N.} = 1,6 \times 10^{-7} \text{ µg par bactérie}$$

$$\text{A.D.N.} = 2,7 \times 10^{-8} \text{ µg par bactérie}$$

Ces résultats sont donc très comparables, et l'extraction peut être considérée comme satisfaisante.

c) Spécificité des dosages.

Si le dosage de l'A.D.N. par la diphénylamine est reconnu être bien spécifique et ne pose pas de problème particulier, il n'en est pas de même pour le dosage de l'A.R.N. par l'orcinol, pour lequel l'A.D.N. interfère. Il fallait donc savoir si l'A.D.N. bactérien, extrait simultanément avec l'A.R.N., pouvait, aux concentrations où il se trouve, fausser le dosage.

Nous avons préparé des gammes étalons d'A.R.N. et d'A.D.N., allant toutes deux de zéro à 100 µg/ml, et sur les deux gammes, nous avons effectué la réaction à l'orcinol, et tracé les courbes correspondantes (courbe n° 32).

Nous constatons que 100 µg d'A.D.N. donnaient la même coloration que 12 µg d'A.R.N. : la réaction est donc environ huit fois moins sensible avec l'A.D.N. qu'avec l'A.F.N. (notons que ces chiffres sont en accord avec ceux de PAOLETTI (67) qui trouvait une sensibilité dix fois moindre pour l'A.D.N.).

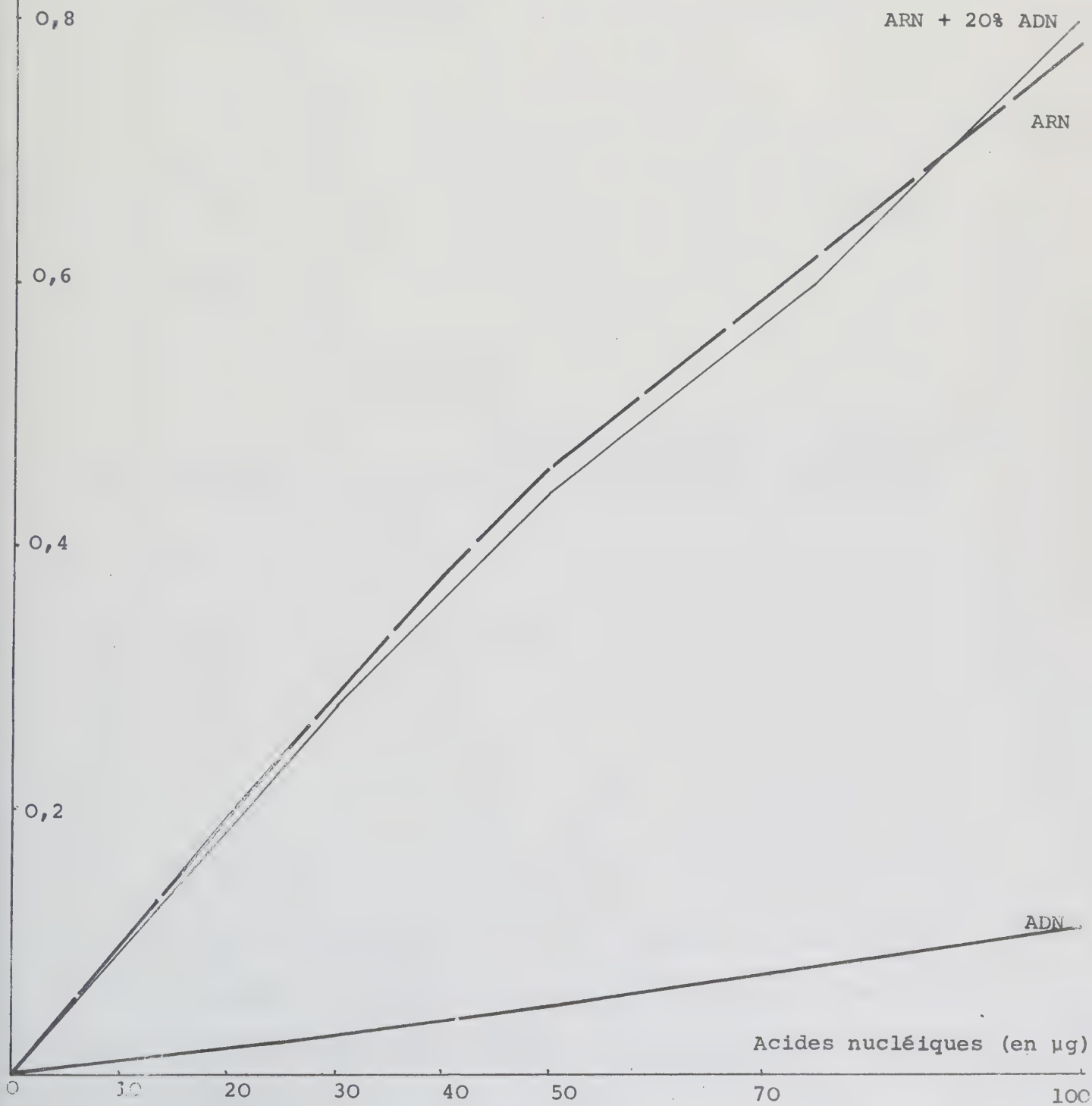
Sachant que le taux d'A.D.N. dans une bactérie, est dans un rapport de un à cinq par rapport à l'A.R.N., l'erreur dans le dosage serait environ 2 à 2,5 %, ce qui est négligeable, compte tenu de la précision de l'extraction.

Cependant, afin de s'assurer que l'A.D.N., mélangé à l'A.R.N., se comporte de la même façon qu'isolément, nous avons effectué un nouveau dosage en comparant la coloration donnée par une gamme étalon

D.O
à 660 mμ

- 90 -

Courbe n° 32 - Dosage de l'ADN et de l'ARN par la technique de Bial-Moulé



d'A.R.N. pur à celle obtenue avec une gamme identique d'A.R.N., mais dans laquelle était additionné, chaque fois, 20 % d'A.D.N.. Les deux courbes obtenues (courbe n° 32) étaient sensiblement superposées.

Ainsi, nous pensons que la réaction à l'orcinol, dans les conditions de notre étude, permet réellement de doser l'A.R.N. bactérien, à condition toutefois de ne pas vouloir en faire une technique trop précise.

II - LES RESULTATS.

1) Action de la bacitracine, après trois heures de contact, sur les acides nucléiques de bactéries se multipliant.

a) Etude des acides nucléiques de St. aureus.

Les dosages effectués sur des bactéries en condition de multiplication (en bouillon peptoné salé) après trois heures de contact avec l'antibiotique, sont groupés dans le tableau n°4.

Dans la première colonne, nous avons noté la concentration en bacitracine (exprimée en µg/ml) des échantillons examinés; dans la deuxième colonne, la teneur en germes (en milliards par ml), dans la troisième et la cinquième les quantités d'A.R.N. et d'A.D.N. contenues dans les échantillons en prenant pour référence (égale à cent par définition) les valeurs déterminées expérimentalement au temps zéro (témoin ou suspensions contenant l'antibiotique donnant les mêmes résultats).

Tableau n° 4. Action de la bacitracine sur les acides nucléiques
de Staphylococcus aureus en phase multiplicative.

Bacitracine en µg/ml		Nombre de bactéries 1×10^9	A. R. N.		A. D. N.	
			qté totale	qté/nbre bactéries	qté totale	qté/nbre bactéries
Ts les échantillons au temps zéro		1	100	100	100	100
Après trois heures	Témoin	2,53	249	98	255	101
	1	2,4	212	88	253	105
	2	2,25	151	67	227	101
	5	1,67	127	76	150	90
	20	1,12	77	69	107	95
	50	1,09	58	53	93	85
	100	1,09	60	55	95	87
	500	0,98	61	62	87	89
	2000	0,80	44	55	71	89
	10000	0,94	51	54	79	84

Dans les quatrième et sixième colonnes, nous avons fait le rapport de la quantité d'acides nucléiques sur le nombre de bactéries, pensant qu'il était surtout intéressant de connaître le taux d'acides nucléiques par bactérie, afin de pouvoir comparer bactéries normales et bactéries traitées par l'antibiotique.

Remarquons que, pour les bactéries témoins, ce rapport restait très voisin de 100 après les trois heures de mise en contact avec un milieu neuf (98 pour l'A.R.N. et 101 pour l'A.D.N.). En effet, bien qu'il soit connu que la quantité d'acides nucléiques varie selon l'âge des germes, il faut rappeler que ce que nous avons appelé temps zéro (temps d'introduction de l'antibiotique) représentait en réalité des staphylocoques âgés de deux heures trente (préculture).

Lorsque une petite quantité de bacitracine était introduite dans le milieu de culture (2 µg/ml), la quantité d'A.R.N. baissait (67 % par rapport au témoin), et ceci jusqu'à une valeur minimum (autour de 55 %) dès que la concentration de 50 µg/ml était atteinte.

L'A.D.N. semblait peu (ou pas touché, restant aux alentours de 90 % jusqu'à une concentration de 2 000 µg/ml ; la précision de la technique ne permet pas de conclure sur une action aussi discrète.

b) Etude des acides nucléiques d'E.coli.

Une étude comparable a été effectuée sur Escherichia coli.

Tableau n° 5. Action de la bacitracine sur les acide nucléiques
d'Escherichia coli en phase multiplicative.

Bacitracine en µg/ml		Nombre de bactéries 1×10^9	A.R.N.		A.D.N.	
			qté totale	qté/nbre bactéries	qté totale	qté/nbre bactéries
Ts les échantillons au temps zéro		1	100	100	100	100
Après trois heures	Témoin	2,15	200	93	203	94
	200	2,05	144	70	130	93
	1000	1,4	93	67	136	97
	5000	0,7	39	56	35	50
	10000	0,4	9	22	9,5	24

Pour cette espèce bactérienne, les taux d'acides nucléiques augmentaient en valeur absolue (ou restaient stables) pour les concentrations infra-bactériostatiques de bacitracine, mais chutaient brusquement dès que la concentration inhibitrice de la multiplication (2 000 µg/ml) était atteinte.

Si l'on se réfère à la quantité contenue par bactérie, le taux d'A.R.N. baissait très fortement (jusqu'à 22 %), et proportionnellement à la concentration de bacitracine mise en jeu. Quant à l'A.D.N., il faut remarquer qu'il ne semblait nullement touché pour les concentrations infra-bactériostatiques, mais baissait brutalement et intensément (jusqu'à 24 %), lorsque une concentration supra-bactériostatique était mise en cause.

Cette simultanéité, pour une même concentration (2 000 µg/ml) de la déficience en A.D.N. de la bactérie, et de la perte de son pouvoir de prolifération peut suggérer que les deux effets sont liés.

2) Etude cinétique de la variation des acides nucléiques.

Pour approfondir ce travail, nous avons voulu suivre, au cours du temps, la variation quantitative des acides nucléiques bactériens en les dosant après une heure, deux heures et trois heures de contact chez des microorganismes traités par une concentration

infra-bactériostatique et une concentration supra-bactériostatique de bacitracine, comparant, bien entendu, les résultats avec ceux obtenus dans les mêmes conditions avec des bactéries non traitées.

Parallèlement, nous avons dénombré ces bactéries et suivi leurs courbes de croissance par un enregistrement en continu de l'opacité des cultures au biophotomètre de BONNET-MAURY.

a) Staphylococcus aureus.

Les concentrations de bacitracine choisies étaient 2 µg/ml et 50 µg/ml (cinq fois moins et cinq fois plus que la concentration bactériostatique).

La multiplication des bactéries (tableau n° 6), en présence de 2 µg/ml d'antibiotique, était sensiblement identique à celle des germes témoins; le taux d'A.D.N. restait inchangé, tandis que la quantité d'A.R.N. diminuait progressivement au cours du temps : 87 % après une heure de contact, 76 % après deux heures, et 67 % après trois heures.

Lorsque St.aureus était mis en contact avec 50 µg/ml de bacitracine, la multiplication demeurait normale pendant le premier quart d'heure, puis la courbe de croissance s'infléchissait, sans doute par un phénomène associé de lyse et de multiplication, pour aboutir, après trois heures, au même nombre de germes qu'en début d'expérience.

La teneur en A.D.N. des bactéries ainsi traitées semblait très

Tableau n° 6. Etude cinétique de la multiplication et de la teneur
en acides nucléiques de St.aureus en présence de bacitracine.

Bacitracine en µg/ml	Temps	Nombre de bactéries 1×10^7	A.R.N.		A.D.N.	
			qté totale	qté/nbre bact	qté totale	qté/nbre bact.
<u>Témoin</u>	0	1	100	100	100	100
	1 h	2,01	190	95	163	91
	2 h	2,36	213	90	212	90
	3 h	2,53	249	98	215	101
<u>2 µg/ml</u>	0	1	100	100	100	100
	1 h	1,95	170	87	205	105
	2 h	2,29	175	76	216	94
	3 h	2,25	151	67	227	101
<u>50 µg/ml</u>	0	1	100	100	100	100
	1 h	1,57	90	57	127	61
	2 h	1,98	91	46	156	79
	3 h	1,09	58	53	93	85

légèrement abaissée (la précision de la technique ne permet pas de l'affirmer) après une heure de contact, et restait stable ensuite : 81, 79 et 85 % après une, deux et trois heures de contact.

Quant à l'A.R.N., dès après la première heure, les bactéries n'en renfermaient plus que 57 % de la teneur normale, et ce taux ne semblait pas varier par la suite (53 % après trois heures).

b) Escherichia coli.

La croissance d'E.coli (tableau n° 7), en présence de 1 000 ou 10 000 µg/ml de bacitracine (concentration deux fois inférieure ou cinq fois supérieure à la concentration bactériostatique) était identique à celle du témoin pendant la première demi-heure, puis la lyse apparaissait très brutalement pour la forte concentration de l'antibiotique, alors qu'elle était équilibrée par la multiplication pour la concentration plus faible.

Le taux d'A.D.N. bactérien n'était nullement modifié à la concentration de 1 000 µg/ml, alors que le taux d'A.R.N. diminuait progressivement dans le temps : 85 % après une heure de contact, 67 % après trois heures.

A la concentration de 10 000 µg/ml, la bacitracine semblait faire baisser, dans les mêmes proportions, A.D.N. et A.R.N., et de plus en plus au fur et à mesure que le temps de contact se prolongeait (de 57 à 22 % entre une et trois heures de contact). La dégradation des acides nucléiques paraît donc, dans ce cas, particulièrement intense.

Tableau n° 7. Etude cinétique de la multiplication et de la teneur
en acides nucléiques d'E.coli en présence de bacitracine.

Bacitracine en µg/ml	Temps	Nombre de bactéries 1×10^9	A.R.N.		A.D.N.	
			qté totale	qté/nbre bact	qté totale	qté/nbre bact
<u>Témoin</u>	0	1	100	100	100	100
	1 h	1,9	175	92	180	94
	2 h	1,9	177	93	171	91
	3 h	2,15	200	93	203	94
<u>1 000 µg/ml</u>	0	1	100	100	100	100
	1 h	1,8	153	85	160	89
	2 h	1,7	122	70	143	88
	3 h	1,4	93	67	136	97
<u>10 000 µg/ml</u>	0	1	100	100	100	100
	1 h	0,8	41	51	46	57
	2 h	0,7	23	33	22	32
	3 h	0,4	9	22	9,5	24

Mais il faut souligner que si les taux d'acides nucléiques, exprimés par bactérie, représentent une moyenne, il s'agit, en réalité, d'une population hétérogène (morphologiquement surtout pour E.coli, et physiologiquement pour les deux espèces bactériennes) et il est évident que chaque bactérie n'est pas touchée de la même façon par l'antibiotique. Si la technique d'extraction met hors de cause les acides nucléiques des bactéries lysées (éliminés après centrifugation et lavage des bactéries), les microorganismes restants étaient dans des états physiologiques différents : certains étaient encore capables de se multiplier, d'autres étaient en état de "stase", d'autres enfin, sur le point de se lyser.

Dans des essais précédents, nous avons montré qu'en l'absence de substances nutritives (en solution tampon), la bacitracine n'exerçait aucun pouvoir lytique, ni variations morphologiques, et ces bactéries "quiescentes" se présentaient alors dans un état physiologique plus homogène. Il nous a paru intéressant de procéder, dans les mêmes conditions, aux dosages des acides nucléiques chez de telles bactéries.

3) Dosage des acides nucléiques chez les bactéries "quiescentes".

Les bactéries âgées de deux heures pour E.coli, et de deux heures trente pour St.aureus, parfaitement débarrassées de toute

Tableau n° 8. Action de la bacitracine sur la teneur en acides
nucléiques des bactéries quiescentes.

<u>Staphylococcus aureus</u>				<u>Escherichia coli</u>		
Bacitracine en µg/ml		A.R.N.	A.D.N.	Bacitracine en µg/ml	A.R.N.	A.D.N.
Temps zéro	Tous les échantillons	100	100	Tous les échantillons	100	100
Après trois heures de contact	Témoin	104	101	Témoin	103	97
	5	90	102			
	100	107	93			
	500	87	118	500	112	108
	2 000	90	103	2 000	104	108
	10 000	95	97	10 000	93	111

substance nutritive, étaient remises en suspension en solution tampon en présence de diverses concentrations de bacitracine durant trois heures à 37°C.

Sur le tableau n° 8, nous portons les teneurs en acides nucléiques déterminées dans ces conditions, et rapportées à une bactérie, en posant, par définition, une teneur égale à cent dans tous les échantillons au temps zéro où l'antibiotique était introduit.

Nous constatons, aux erreurs expérimentales près, que le taux d'A.R.N., comme celui d'A.D.N., restait constant, quelque fût la concentration de bacitracine utilisée : cet antibiotique serait donc sans action sur les acides nucléiques déjà formés, et n'interviendrait qu'au cours de leur genèse.

Dans cette série d'essais, nous avons pu montrer que la teneur en acides nucléiques des bactéries à l'état de repos n'était pas modifiée par la bacitracine, mais, dans une population en multiplication, une action se manifestait, action qui semblait différente selon qu'elle s'exerçait sur Staphylococcus aureus ou sur Escherichia coli.

Dans le cas de Staphylococcus aureus, le taux d'A.D.N. était peu, ou pas, modifié après trois heures de contact avec l'antibiotique, même aux plus fortes concentrations.

La teneur en A.R.N. baissait légèrement dès les faibles concentrations, et ceci jusqu'à une teneur avoisinant 55 % du

temoin ; cette déficience semblait se produire dès la première heure de contact, et se stabiliser ensuite.

Dans le cas d'Escherichia coli, pour des concentrations infra-bactériostatiques, il n'y avait pas de modification de la teneur en A.D.N., alors que le taux d'A.R.N. baissait proportionnellement à la concentration et au temps de contact (67 % après trois heures de traitement par 1 000 µg/ml de bacitracine).

Pour les concentrations supra-bactériostatiques, les taux d'A.D.N. et d'A.R.N. diminuaient très fortement et dans les mêmes proportions, et cette baisse s'accroissait lorsque le temps de contact se prolongeait (seulement 57 % après une heure et 22 % après trois heures).

Cette différence d'action à l'égard de St.aureus et d'E.coli (la bactérie sensible à l'antibiotique étant moins touchée que la bactérie résistante) suggère une hypothèse : pour les bactéries très sensibles (St.aureus), l'action sur les acides nucléiques est relativement peu intense, voire nulle, car elle ne serait que secondaire, un autre processus (?) agissant avant, en arrêtant les synthèses pour des très faibles concentrations. La plupart des bactéries deviendraient alors comme "quiescentes", et l'on s'explique alors que la diminution du taux d'acides nucléiques, comme la lyse, demeurent discrètes.

Par contre, pour Escherichia coli, résistant à de fortes concentrations de bacitracine, les synthèses resteraient très actives, puis, brusquement, lorsque la concentration de l'antibiotique est suffisamment élevée, la formation des acides nucléiques est fortement entravée, bien que la multiplication soit encore possible ; la population deviendrait particulièrement hétérogène, des bactéries intactes se trouvant mêlées à des bactéries très anormales qui se lyseraient par la suite.

Une telle hypothèse permettrait d'expliquer que, pour E.coli, concentration bactériostatique, concentration lytique (en bouillon) et concentration entraînant une forte baisse simultanée de l'A.D.N. et de l'A.R.N., soient identiques, alors qu'il en va tout autrement pour St.aureus.

CONCLUSIONS

=====

Nous avons cherché, dans des conditions de travail aussi unifiées que possible, à examiner les modalités d'action de la bacitracine sur un germe sensible (Staphylococcus aureus, souche Oxford) et sur un microorganisme naturellement résistant (Escherichia coli, souche Lausanne 416).

Après avoir déterminé les concentrations utiles pour obtenir la bactériostase, nous avons observé les courbes de croissance, en présence de faibles concentrations de l'antibiotique, remarquant, au moins en ce qui concerne St.aureus, que le retard des cultures ne devait pas être imputé à un allongement du temps de génération, mais à une inhibition du pouvoir de multiplication d'un nombre plus ou moins considérables de bactéries.

Nous avons ensuite étudié l'activité bactéricide de la bacitracine vis-à-vis des souches en essai, en calculant le pourcentage de bactéries encore capables de proliférer après un contact plus ou moins long avec l'antibiotique, mais après que celui-ci ait

été éliminé du milieu de subculture.

Cette étude a montré que, pour des bactéries prélevées en phase de croissance, la bacitracine avait un pouvoir bactéricide total en quatre heures dans le cas d'E.coli (avec 5 000 µg/ml), quelques germes seulement échappant à cette action dans le cas de St.aureus (50 µg/ml et plus).

Lorsque les bactéries étaient à l'état de repos physiologique, l'action bactéricide était nettement plus réduite à l'égard de St.aureus, quelque soit le milieu de contact (eau physiologique ou bouillon), tandis qu'E.coli demeurait bien sensible à la condition que des substances nutritives soient ajoutées en même temps que l'antibiotique. Ces faits pouvaient s'expliquer si l'on admettait que l'action bactériostatique de la bacitracine était immédiate à l'égard de St.aureus, alors qu'E.coli conservait encore pendant un moment son pouvoir de prolifération.

L'examen des courbes de croissance, en présence de fortes concentrations de l'antibiotique, est venue confirmer cette hypothèse et a, de plus, montré que la bactéricidie était, en grande partie, due à une action lytique de la bacitracine, action se manifestant aussi plus spécialement sur les bactéries proliférantes. C'est dire que, dans ces conditions, il y avait une altération de la synthèse des constituants de la paroi bactérienne.

Ce fait avait pour conséquence l'induction possible de protoplastes par la bacitracine chez E.coli, dont la lyse en milieu isotonique et en présence de l'antibiotique, était précédée d'une phase de prolifération. Par contre, pour St.aureus, pour lequel la lyse, bien que progressive, débute dès la mise en contact avec la bacitracine, il se produisait, dans les mêmes conditions d'expérience, des formes très anormales, mais qui n'étaient probablement pas de vrais protoplastes.

Ces expériences soulignent la grande importance de l'état physiologique des bactéries dans leur comportement au contact de la bacitracine, et expliquent les conclusions assez contradictoires des divers auteurs à ce sujet, les conditions de leurs études étant souvent fort différentes. Il semble en effet indispensable de dissocier le phénomène de lyse, reflet d'une action au niveau de la paroi bactérienne, qui se produit chez E.coli comme chez St.aureus lorsque les microorganismes sont en intense activité métabolique, et la perturbation de cette activité métabolique conduisant à la multiplication. Cette inhibition du pouvoir de prolifération semble, en effet, instantanée chez St.aureus, mais précédée d'un temps de latence pour E.coli, ce qui permet, paradoxalement, dans certaines conditions (cultures âgées transportées dans un milieu neuf par exemple) aux cocci de mieux résister que les bacilles à l'action létale de la bacitracine.

D'autre part, la respiration de St.aureus et d'E.coli , en présence de bacitracine, a été étudiée, les substrats choisis étant le succinate de sodium, le pyruvate de sodium et le glucose. Dans tous les cas, la capacité respiratoire rapportée à une bactérie s'est trouvée augmentée, et ceci, proportionnellement à la concentration de l'antibiotique mise en oeuvre. L'hypothèse de la bacitracine intervenant comme agent découplant de la phosphorylation, expliquerait ce phénomène, mais il reste encore à le prouver. Il faut remarquer que cette exaltation de la respiration avait lieu, chez E.coli pour les concentrations seuils inhibant la multiplication (2 000 µg/ml) et qu'il fallait atteindre des concentrations similaires pour obtenir les mêmes résultats avec St.aureus, soit 200 fois la concentration conduisant à la bactériostase.

Enfin, le dosage des acides nucléiques chez les bactéries ayant été, ou non, en contact avec la bacitracine, a montré que cette teneur était sans changement chez les cellules non proliférantes. Lorsque le milieu de contact contenait des substances nutritives, la teneur en A.D.N. de St.aureus n'était presque pas modifiée, même pour de très fortes concentrations de l'antibiotique (84 % de la teneur normale après trois heures de contact avec 10 000 µg/ml), alors que la teneur en A.R.N. était abaissée (50 à 60 % de la teneur normale pour des concentrations égales ou supérieures à 50 µg/ml).

En ce qui concerne E.coli, la teneur en A.D.N. restait normale pour les concentrations infra-bactériostatiques, mais baissait très fortement au delà (24 % avec 10 000 µg/ml en trois heures). La teneur en A.R.N. diminuait dès la mise en contact avec de faibles concentrations, et de plus en plus, lorsque celles-ci s'élevaient (70 % avec 200 µg/ml, et 22 % avec 10 000 µg/ml).

Ces faits généraux étant acquis, il nous a paru intéressant, pour mieux comprendre le mode d'action de la bacitracine, de grouper, sous une forme très concise (tableau n° 9) les principaux résultats expérimentaux obtenus pour chaque microorganisme, avec une concentration unique de l'antibiotique, que nous avons choisie assez voisine de la concentration bactériostatique, soit 50 µg/ml pour St.aureus, et 5 000 µg/ml pour E.coli.

De l'examen de ce tableau, il ressort que si la bacitracine agissait sur des bactéries proliférantes, une grande partie de la population, ou la totalité, subissait la lyse. Cette lyse, témoin d'une anomalie des constituants de la paroi, se produisait chez St.aureus et E.coli, lorsque le contact avec l'antibiotique avait lieu sur de jeunes bactéries en phase de multiplication active, mais seulement chez E.coli, s'il s'agissait de bactéries âgées transportées dans un milieu neuf. Cette différence d'action semble imputable au fait que la bacitracine exerçait une action

Tableau n° 9. Action comparative de la bacitracine à l'égard de Staphylococcus aureus (50 µg/ml) et Escherichia coli (5 000 µg/ml), concentrations proches de la concentration bactériostatique.

	<u>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</u>	<u>ESCHERICHIA COLI</u>
<u>Morphologie</u>	Inchangée	Polymorphisme
<u>Action bactéricide</u> 1million/ml bactéries <u>jeunes</u> (%age survivants)	Après 1heure, eau 45% surviv. bouillon 7% Après 2heures, eau 5% surviv. bouillon 2%	Après 1heure, eau 10% surviv. bouillon 5% Après 2heures, eau 3% surviv. bouillon 0%
<u>Action bactéricide</u> 1million/ml bactéries <u>âgées</u> (%age survivants)	Après 1heure, eau 100% surviv. bouillon 100% Après 2heures, eau 45% surviv. bouillon 45%	Après 1heure, eau 53% surviv. bouillon 14% Après 2heures, eau 18% surviv. bouillon 3%
<u>Action lytique</u>	Immédiate, seulement sur bactéries jeunes en voie de prolifération	Seult sur bact. proliférantes non immédiate, donc aussi sur bact. âgées mises en milieu neuf
<u>Protoplastes</u>	non induits	induction possible
<u>Respiration</u>	non modifiée	stimulation
<u>Teneur en acides</u> <u>nucléiques</u> (%age par rapport à la normale)	Contact en tampon : ADN 100% ARN 100% Contact en bouillon ADN 85% ARN 53%	Contact en tampon : ADN 100% ARN 100% Contact en bouillon ADN 50% ARN 56%
<u>N.B.</u> Ces résultats concernent des concentrations <u>différentes</u> de bacitracine pour <u>St.aureus</u> et <u>E.coli</u> , cette concentration étant choisie pour chacun, proche de la concentration bactériostatique, à savoir : 50 µg/ml pour <u>St.aureus</u> 5 000 µg/ml pour <u>E.coli</u> .		

bactériostatique immédiate à l'égard des cocci, mais précédée d'une phase de latence pour les bacilles.

Lorsque les bactéries échappaient à l'action lytique de l'antibiotique, le métabolisme était plus ou moins modifié selon l'espèce en cause.

Aux concentrations proches de la concentration bactériostatique, l'activité métabolique de St.aureus semblait relativement peu touchée : la respiration, comme la teneur en A.D.N. était pratiquement normale; seul, le taux d'A.R.N. était abaissé (55% par rapport à la normale), et il faut noter que cette diminution, comme l'inhibition du pouvoir de multiplication était très précoce (dès la première heure).

Le métabolisme d'E.coli s'effectuait de manière très désordonné et conduisait à des altérations importantes dans la morphologie. La respiration était très exaltée, laissant supposer une incapacité à mettre en réserve l'énergie nécessaire à d'autres synthèses, ou bien le gaspillage de cette énergie. Plus profondément, la teneur en A.D.N., comme celle de l'A.R.N., diminuait fortement, et il faut souligner que bactériostase et chute du taux d'A.D.N. étaient obtenus pour une concentration identique de bacitracine.

Ainsi, aux concentrations inhibant la multiplication, les altérations semblent, contre toute attente, beaucoup plus profondes pour Escherichia coli que pour Staphylococcus aureus.

Eclairant ces faits expérimentaux à la lumière des travaux précédemment publiés au sujet du mode d'action de la bacitracine, nous pouvons maintenant tenter de cerner le problème d'un peu plus près.

1) L'action létale de la bacitracine semble être totalement sous la dépendance de l'état physiologique des bactéries. Contrairement aux résultats obtenus par GUNNISON (42) et par SEIGNEURIN (80), mais en accord avec PAINE (42), GROS (40) et SNOKI (87), nous avons observé que la bactéricidie n'avait lieu que pour des cellules en phase de multiplication.

2) Des lésions importantes sont provoquées au niveau de la paroi bactérienne, se manifestant par :

- une bactériolyse en milieu isotonique, mise en évidence par ABRAHAM (1) et WEINBERG (101) chez St.aureus, et dont nous avons pu suivre les modalités au biophotomètre enregistreur, à la fois sur St.aureus et sur E.coli.
- la formation de protoplastes en milieu hypersucré, au moins en ce qui concerne les bactéries Gram négatives : KRAWITT (54) sur Proteus, GANANCIA (37) et nous-même sur E.coli.

Cette atteinte ne se produit qu'au moment de la synthèse des constituants pariétaux, provoquant une accumulation, dans le milieu

de culture, de certains précurseurs de la paroi (2),(69). Les récentes études de SIEVERT et STROMINGER (83) permettent de situer très exactement ce blocage au niveau d'une réaction de déphosphorylation de l'UDP-acétylmuramyl-pentapeptide, intermédiaire au cours de la formation des couches linéaires de la paroi, alors que le dernier stade de la fabrication du mucopeptide, la formation des " liaisons croisées" entre peptides n'est pas perturbée (104).

Nous avons montré l'instantanéité de cette action pariétale chez St.aureus, alors qu'un temps de latence, vraisemblablement motivé par la pénétration plus lente de l'antibiotique au travers de la paroi des bactéries Gram négatives, était requis pour E.coli.

Cette instantanéité de l'action chez les cocci Gram positifs explique l'impossibilité rencontrée par SMITH (86), comme par nous-même, de former des protoplastes à partir de ces bactéries sous l'action de la bacitracine, car ces protoplastes éventuels ne pourraient être que des cellules formées en présence de l'antibiotique, ce qui ne se produit pas, contrairement à ce qui peut survenir aux bactéries Gram négatives.

3) Cette atteinte de la paroi n'est pas le "primum movens" de la toxicité de la bacitracine à l'égard des bactéries, puisque les protoplastes, formés par action du lysozyme ou de la pénicilline, sont sensibles à l'action de la bacitracine (82),(44), la perméabilité ne conditionnant que les différences de sensibilité (87).

4) Le site d'attaque primaire de la bactérie par la bacitracine paraît être la membrane cellulaire, et plus particulièrement ses invaginations internes que sont les mésosomes.

Au moment même où nous effectuions ce travail, et par une toute autre approche, RIEBER, INAEDA et CESARI (87) sont venus étayer très fortement cette hypothèse : étudiant au microscope électronique des cellules de Mycobacteria tuberculosis B.C.G., ces auteurs montrent que l'antibiotique à forte concentration (indispensable à cause de la teneur élevée en lipides de la paroi de ces bactéries leur conférant une certaine résistance), et après un long temps de latence, provoquait une désorganisation de la membrane plasmatique, et en particulier des mésosomes qui finissaient par disparaître.

Nos travaux nous ont plus spécialement permis d'observer les altérations fonctionnelles de ces mésosomes, provoquées par la bacitracine.

A l'heure actuelle, il semble qu'à ceux-ci soient dévolues plusieurs activités au sein de la cellule bactérienne (111) :

- contrôler la réplication du chromosome
- élaborer la paroi cellulaire
- coordonner l'équilibre entre ces deux synthèses
- être le support des enzymes respiratoires, et accumuler l'énergie libérée au cours des réactions de l'oxydation des substrats en aérobiose.

Or les désordres provoqués par la bacitracine se situent précisément à tous ces niveaux :

a) La réplication du chromosome ne peut plus s'effectuer : c'est la bactériostase, perturbation immédiate chez St.aureus, chez lequel la barrière pariétale est aisément franchie, et, à plus long terme et pour des concentrations plus élevées pour E.coli.

Il est à remarquer que, pour les très faibles concentrations de bacitracine, cette inhibition de la multiplication est pratiquement le désordre unique chez St.aureus, ce qui tend à prouver que c'est le site même de l'action (étant la seule perturbation qui ne suppose pas de synthèses préalables pour se manifester).

Il faut aussi rappeler que, s'il a été souvent possible de produire des protoplastes, formes non proliférantes, en présence de bacitracine, tous les auteurs s'accordent pour dire que les formes L, capables de se propager, n'ont jamais pu être obtenues (55), (61), (104).

b) L'élaboration de la paroi est perturbée, nous l'avons vu précédemment, et il a été démontré (83) que la réaction inhibée avait précisément lieu au niveau de la membrane.

c) La coordination entre croissance et prolifération ne serait plus assurée sous l'action de la bacitracine, et provoquerait des variations morphologiques. Chez E.coli, pendant le temps de latence,

il est normal que le noyau ait pu se multiplier, ce processus étant toujours en avance sur la scission, mais la division cellulaire ne pourrait pas s'achever : ainsi seraient formées les formes géantes et très anormales que nous avons souvent observées. Des photographies de ces bactéries au microscope électronique seraient utiles pour vérifier cette hypothèse.

d) La respiration est fortement stimulée : elle ne permettrait plus l'accumulation de l'énergie nécessaire à la bactérie pour effectuer ses synthèses, la bacitracine agissant comme agent découplant de la phosphorylation.

Si cette supposition reste encore à confirmer, il faut cependant remarquer que de nombreuses réactions mettant en cause le phosphate organique ont été signalées comme perturbées par la bacitracine : accumulation d'uridine-5-pyrophosphate de N-acétyl-aminosucrose, précurseur de la paroi (70), inhibition de la déphosphorylation d'un lipide pyrophosphate, également intermédiaire de la synthèse du glycopeptide de la paroi (83), et ceci, quelque soit l'origine des enzymes entrant en jeu dans la réaction : bactéries entières (Micrococcus lysodeikticus et Staphylococcus aureus), phosphomono-estérase isolée d'Escherichia coli, ou phosphatase alcaline extraite du mucus intestinal de veau.

Ainsi, cette hypothèse d'une toxicité élective de la bacitracine sur les mésosomes bactériens, nous paraît rendre pleinement cohérents les travaux de recherche très divers effectués dans le but de déceler ce mode d'action, et permet, en particulier, d'expliquer ce paradoxe auquel nous nous sommes heurtée tout au long de ce travail, à savoir que, pour des concentrations élevées d'antibiotique, des lésions plus profondes sont observées chez Escherichia coli considéré comme résistant, que chez Staphylococcus aureus réputé bien sensible.

B I B L I O G R A P H I

=====

- (1) ABRAHAM E.P. Biochemistry of some peptid and steroid antibiotics.
Ed. H.WILEY New-York, 1957
- (2) ABRAHAM E.P. and NEWTON G.G.F. Structure and function of some sulphur containing peptides. In CIBA foundation symposium on amino acids and peptids with antimetabolic activity. J.and A. CHURCHILL Ltd London 1958, 6, 205-225
- (3) ADLER R.M.and SNOKE J.E. Requirement of divalent metal ions for bacitracin activity. J.Bacteriol., 1962, 83, 1315-17.
- (4) ANDERSEN A.A., MICHENER H.D. and OLCOTT H.S. Effect of some antibiotics on Clostridium botulinum. Antibiot.and Chemot.1953, 3, 521-26
- (5) ANDERSON J.S., MATSUMASHI M.A. and STROMINGER J.L. Lipidphosphoacetyl-muramyl pentapeptide and lipid phosphodisaccharide pentapeptide, presumed membrane transport intermediates in cell-wall synthesis. Proc. Natl. Acad.Sc. U.S.,1965, 53, 881.
- (6) ANDRIEU G., MONNIER J. et BOURSE R. La sensibilité du bacille pyocyanique aux agents antibactériens d'utilisation clinique. Ann.Inst. Pasteur 1957, 92, 176-88 et 321-33.
- (7) ANKER H.S., JOHNSON B.A., GOLDBERG J. and MELENEY F.L. Bacitracin,methods for production, concentration and partial purification with a summary of the properties of crude bacitracin.J.Bact.1948,55, 249-55
- (8) ARONSON J.N. in Antibiotics,vol.I Mechanism of action - Bacitracin (E.D. WEINBERG) p.90-101 Springer Verlag Berlin, Heidelberg New-York.D.GOTTLIEB and P.D. SHAW,editors (1967)

- (9) BACHMAN M.C. In vitro, studies on possible synergistic action between penicillin and bacitracin. J.Clin.Investigation, 1949, 28, 864-866.
- (10) BEIGNOT-DEVALMONT M., CARRERE C. et LAMBIN S. Influence de divers agents surfactifs sur l'activité respiratoire des bactéries. Ann. pharm. fr., 1966, 24, 167-72.
- (11) BERNARD J. et LAMBIN S. Etude de l'activité bactéricide de la céphaloridine. Modalité d'action. Ann.Inst.Pasteur, 1965, 109, 906-21
- (12) BERTOYE A. et COURTIEU A.L. Sensibilité à vingt et un agents antibactériens de quinze cultures de Pseudomonas isolés de produits pathologiques humaine. Compt.Rend.Soc.Biol., 1954, 148, 1412-15.
- (13) BIAL M. Dent.med.woschchr., 1903, 29, 253 et 477
- (14) BONET-MAURY P. et WALEN J.R. Ann.Inst.Pasteur , 1945, 71, 284
- (15) BROCK T.D. Effect of antibiotics and inhibitors on M protein synthesis. J.Bacteriol., 1963, 85, 527.
- (16) BRYGOD E.. et COURDURIER J. L'effet, in vitro, d'antibiotiques sur 101 souches de Pasteurella pestis de Madagascar. Ann.Inst. Pasteur, 1955, 89, 118-21.
- (17) BURTON K. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of DNA. Biochem.J., 1956, 62, 315
- (18) CHABBERT V. et VERON M. Action des associations d'antibiotiques sur les staphylocoques polyrésistants. Ann.Inst.Pasteur, 1955, 88, 656-60.
- (19) CODINGTON J.F. Studies on the relationship between biologic properties and composition in bacitracin. Antibiotics Annual. Medical Encyclopedia Inc. New-York, 1955, p.1118-25.

- (20) COHEN J.O. and PRATT. D.B. The effect of culture media components on the sensitivity of *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* to bacitracin. *Antibiot.chemoth.*, 1956, 6, 475-79.
- (21) CHAWFORD K. and ABRAHAM E.P. The synergistic action of cephalosporin C and benzylpenicillin against a penicillinase producing strain of *St.aureus*. *J.gen. Microbiol.*, 1957, 16, 404-13.
- (22) CREASER E.H. The induced (adaptative) biosynthesis of β -galactosidase in *St.aureus*. *Antibiot. and Chemoth.*, 1960, 10, 758-65.
- (23) CREMA A. et BAROLI F. Azione della terramicina sulla respirazione di alcuni germi e di alcuni tessuti. *Boll.Soc.Ital.Biol.sper.* 1951, 27, 29-35.
- (24) DEL LOVE B.J. and FINLAND M. IN vitro, susceptibility of Meningococci to eleven antibiotics and sulfadiazine. *Am.J.med.* 1954, 228, 534-9
- (25) DESVIGNES A. Contribution à l'étude de quelques facteurs susceptibles d'influencer la phagocytose des bactéries. Thèse Doctorat Pharmacie. Paris, 1962.
- (26) DISCHE Z. Über einige neue charakteristische farbreaktionen der thymonuklein saure und eine mikromethode zur bestimmung derselben in tierschen organen mit hilfe dieser reaktionen. *Mikrochemie*, 1930, 8, 4
- (27) DUCHENNE J. Des modalités d'action des solvants organiques sur l'évolution des courbes de croissance bactérienne. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Paris, 1961.
- (28) E GLE H., LEVY M. and FLEISCHMAN R. The effect of the pH on the antibacterial action of penicillin, streptomycin, chloramphenicol, terramycin and bacitracin. *Antibiot and Chemoth.* 1952, 2, 563-75
- (29) EVANS F.L. A note of the susceptibility of *Hemophilus influenzae* type B to bacitracin. *J. Bacteriol.* 1946, 56, 507.

- (30) FINLAND M., FRANCK P.F. and WILCOX C. In vitro, susceptibility of pathogenic Staphylococci to seven antibiotics. Am.J.Clin. Pathol., 1950, 20, 325-34.
- (31) FLOUVAT P. et GIROUD J.F. Données actuelles sur le mécanisme d'action des antibiotiques antibactériens. Gaz.Med.fr., 1969, 76, 459-73.
- (32) FRANCK P.F., WILCOX C. and FINLAND M. In vitro, sensibility of coliform bacilli to seven antibiotics. J.Lab.clin.Med. 1950, 35, 188-204
- (33) GAGNIANT D. Peptides naturels à activité antibiotique. Biol.Med. 1965, 54, 331-375.
- (34) GALE E.F. and FOLKES J.P. The assimilation of amino acids by bacteria : The incorporation of labelled aminoacids by disrupted staphylococcal cells. Biochem.J., 1955, 59, 661-75.
- (35) GALE E.F. and FOLKES J.P. The assimilation of aminoacids by bacteria : Action of antibiotics on nucleic acids and protein synthesis in St.aureus. Biochem.J. 1953, 53, 493- 98.
- (36) GALE E.F. and FOLKES J.P. The assimilation of aminoacids by bacteria : the effect of nucleic acids on the development of certain enzymatic activities in disrupted staphylococcal cells. Biochem.J., 1955, 53, 675-84.
- (37) GANANCIA C. L'apparition des protoplastes bactériens sous l'action de substances bactériostatiques. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Paris, 1963.
- (38) GARBUTT J.L., MOREHOUSE H.L. and HANSON A.P. Metal binding properties of bacitracin. J.Agr.Food Chem., 1961, 9, 285
- (39) GESON H.M., FASAN D.F. and COLLINS G.R. Antibiotic studies on β -hemolytic streptococci. Acquired in vitro resistance to bacitracin. Proc.Soc.Exper.Biol.Me . U.S.A., 1950, 74, 505.

- (40) GROS F., BELJANSKI M. et DIACHEBOEUF F.D. Action de la pénicilline sur le métabolisme de l'acide ribonucléique chez St.aureus. Bull.Soc.Chim.Biol., 1951, 33, 1696-1717.
- (41) GROSS H.M. Zinc bacitracin in pharmaceutical preparations. Drug Cosmet. Ind., 1954, 75, 612.
- (42) GUNNISON J.B., KUNISHIGE E. and JAWETZ E. Bactericidal action of neomycin on nonmultiplying bacteria : optimal phenomenon. Antibiot.annuals 1954-55. Med.Encycl.Inc.New York p.190-196.
- (43) HANCOCK R. Protection of St.aureus from some effects of penicillin by media of high osmotic pressure. Biochem.J., 1958, 70, 15-P.
- (44) HANCOCK R. and FITZ JAMES P.C. Some difference in the action of penicillin bacitracin and vancomycin on Bacillus megatherium. J.Bacteriol., 1964, 87, 1044-50.
- (45) HELMS V. and WEINBERG C.D. Mechanism of antibacterial action of N₁-N₅-di-(₃₋₄-dichlorobenzyl)biguanide. In antibacterial Agents and Chemoth., 1962, p.241.
- (46) HICKEY R.J. Bacitracin; its manufacture and uses. Progr.Ind. Microbiol. 1966, 2, 95.
- (47) HINTON N.A. and ORR J.H. The effects of antibiotics on the toxin production of St.aureus. Antibiot.and Chemoth., 1960, 10, 558-65.
- (48) HUGHES D.E. The bacterial cytoplasmic membran. J.Gen.Microbiol. 1962, 29, 39
- (49) JACKSON G.G., COCKE T.M., COLLINS H.S. and FINLAND M. In vitro, sensitivity of pathogenic enteric bacteria to various antibiotics. J.infect.diseases, 1950, 87, 637
- (50) JAWETZ E. and GUNNISON J.B. Antibiotic synergism and antagonism. An assesment of the problem. Pharm.Rew., 1953, 5, 175-92.
- (51) JAWETZ E. Polymyxin, colistin and bacitracin. Pediatr.Clin.North Am., 1961, 8, 1057

- (52) JOHNSON B.A. and MELENEY F.L. Studies on the synergism between penicillin and bacitracin. Ann.N.Y. Acad.sci.,1950, 53, 42-9.
- (53) KLEIN P. Bakteriologische grundlagen des chemotherapeutischen Laboratorium praxis. Springer, 1957. Berlin, Heidelberg.
- (54) KONIGSBERG W. and CRAIG L.C. On bacitracin F. J.organic chem.,1962, 27,934-36
- (55) KRAWITT E.L. and WARD J.R. L phase variants related to antibiotic inhibition of cell wall biosynthesis. Proc.Soc.Exp.Biol., New-York, 1963, 114, 629-31.
- (56) LASCELLES J. Comparative aspects of structure associated with electron transport. In Function and structure in microorganisms. 15th symposium of the Society of Gl.Microbiol.,London,1965, pp.32-55.
- (57) LEMOIGNE M.; DELAPORTE B. et CROSON M. Ann.Inst.Pasteur, 1954, 70, 224.
- (58) LEVINSON M.L. and FRANCK P.F. Differentiation of group A from others β -hemolytic Streptococci with bacitracin. J.Bacteriol., 1955 69, 284-7.
- (59) LOWBURY E.J. Clinical problems of drug resistant pathogens. Brit.Med. Bull.,1960, 16, 73.
- (60) MANDELSTAM J. and ROGERS H.J. Incorporation of amino acids into the cell wall mucopeptide of Staphylococcus, and the effect of an antibiotic on the process. Biochem.J.,1959, 72, 654-62.
- (61) MOLANDER G.W., KAGAN B.M., WEINBERG E.D., HEIMLICH E.M. and BUSSE R.J. Induction by antibiotics and comparative sensitivity of L phase of St.aureus. J.Bacteriol.,1964, 88, 591.
- (62) MOULE Y. Etude des acides nucléiques et de certains dérivés organiques et inorganiques du phosphore dans les tissus animaux. Arch.Sci.Physiol.,1953,7,161.
- (63) NETER E., CORINZKI C.A. Relative efficacy upon Pasteurella multocida of various antibiotics. Proc.Soc.Exper.Biol.Med.USA,1950, 74, 328
- (64) NEWTON R.A. Properties and mode of action of the polymyxins. Bact.Rev.,1956, 20, 14-27.

- (65) NEWTON R.A. Mechanisms of antibiotic action. Ann.Rev.Microbiol.,1965, 19, 209-40.
- (66) NUNHEIMER T.O., cité par LAMBIN S., GERMAN A., CARRERE C. et BERNARD J.
Influence des diverses substances antiseptiques sur la respiration bactérienne. Ann.pharm.fr., 1957, 15, 273-89.
- (67) PAINE T.F. The similarity in action of bacitracin and penicillin on the Staphylococcus. J.Bacteriol., 1951, 61, 259-60.
- (68) PAOLETTI C. et TRUHAUT R. Nucléoprotéines : acides nucléiques et nucléases des tissus animaux. dans Techniques de laboratoire de LOISELEUR J. 1963, Masson ed.Tome I, Fascicule II, p. 1195.
- (69) PARK J.T. Inhibition of cell wall synthesis in St.aureus by chemicals which cause accumulation of wall precursors. Biochem.J.,1958, 70, 2P
- (70) PARK J.T. Inhibition of synthesis of bacterial mucopeptides or proteins by certain antibiotics and its possible significance for microbiology and medicine. In Antimicrobial Agents annual, 1960 Plenum Press Inc. New-York, 1960, pp. 338-342.
- (71) PATTE J.C. Recherches sur les modalités de l'action antibactérienne de la colistine. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Paris 1963.
- (72) PERKINS H.R. Chemical structure and biosynthesis of bacterial cell walls. Bact.Rev., 1963, 27, 18-55.
- (73) PONTREFACT R.D., BERGEROW G. and THATCHER F.S. Mesosomes, in E. coli. J. of Bacteriol., 1969, 97, 367-75.
- (74) REGNA P.P. The chemistry of antibiotics. In Antibiotics, their chemistry and non medical uses. New-York, D.Van NOSTRAND Co Inc, 1959, p.58.
- (75) RHOADES E.R. and MUCHMORE H.G. The effect of amphotericin B on the respiration of Cryptococcus. Antibiotics annual, 1959-60. Med. Encycl. Inc. N-Y, 1960, pp.619-2 .
- (76) RIEBER M., IMAEDA T. and CESARI I.M. Bacitracin action on membranes of Mycobacteria in vitro. J.Gen. Microbiol.,1969,55, 155-59.

- (77) ROTTA J., KARAKAWA W.W. and KRAUSE R.M. Isolation of L forms from group A Streptococci exposed to bacitracin. J.Bacteriol.1965, 89, 1581
- (78) SCHNEIDER W.C. Phosphorous compounds in animal tissues. I- Extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. J.Biol.Chem., 1944, 161, 293.
- (79) SEBASTIEN F. De l'utilisation des membranes filtrantes en microbiologie : détermination de l'activité bactéricide des substances antiseptiques ; contrôles de stérilité. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Paris 1963.
- (80) SEIGNEURIN R. et ACHARD M.L. Croissance microbienne et sensibilité aux antibiotiques. Ann.Inst.Pasteur, 1955, 88, 660-62.
- (81) SHARP V.E., ARRIAGADA A., NEWTON G.G. and ABRAHAM E.P. Ayfivin : extraction, purification and chemical properties. Brit.J.Exptl.Pathol. 1949, 30, 444.
- (82) SHOCKMAN G.D. and LAMPEN J.O. Inhibition by antibiotics on the growth of bacterial and yeast protoplasts.J.Bacteriol.1962, 84, 508-12.
- (83) SIEVERT G. and STROMINGER J.L. Bacitracin, an inhibitor of the dephosphorylation of lipid pyrophosphate, an intermediate in biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. Proc.Nat.Acad. Sci. (Washington), 1967, 57, 767-73.
- (84) SMITH J.L. and WEINBERG E.D. Bacitracin, an antibiotic with a dual mode of action. Bacteriol. Proc., 1961, p.87
- (85) SMITH J.L. Biochemical mechanisms of action of bacitracin. Dissertation Abstracts, 1962, 23, 1878-7
- (86) SMITH J.L. and WEINBERG E.D. Mechanisms of antibacterial action of bacitracin. J.Gen.Microbiol., 1962, 20, 529-69.
- (87) SNOKE J.E. and CORNELL N. Protoplast lysis and inhibition of growth of Bacillus licheniformis by bacitracin. J.Bact., 1965, 89, 415-20

- (88) STONE J.L. Induced resistance to bacitracin in cultures of *St.aureus*.
J. Infect. Disease, 1949, 85, 91-6.
- (89) STRAUSS N. and JANN G.J. Inhibition studies of diphterial succinic
dehydrogenase. J.Bacteriol., 1956, 71, 439-43.
- (90) STUART A.E., KLINE I., STINSON A. and ACKER R.F. A correlation between
lysozyme, antibiotic and phage resistance in *Bacillus*
megatherium. Bacteriol. Proc., 1962, p.33.
- (91) SWALLOW D.L. and ABRAHAM E.P. Formation of Σ (amino-succinyl) lysine
from Σ aspartyl-lysine from bacitracin A and from cell walls
of lactobacilli. Biochem.J. 1958, 70, 364-73
- (92) SZYBALSKI W. and BRYSON V. Genetic studies on microbial cross resistance
to toxic agents. I- Cross resistance of *E.coli* to fifteen
antibiotics. J. Bacteriol., 1952, 64, 489.
- (93) TOUMANOFF C., VIRAT B., LAPIED M. et MALMANCHE Mme. Action des
antibiotiques et des sulfamides in vitro sur les bactéries
aérobies sporulées. Ann.Inst.Pasteur, 1955, 88, 563-75.
- (94) TRACE J.C. and EDDS G.T. The influence of cobalt on the action of
antibiotics. Am.J.Veter.Res., 1954, 15, 639-42.
- (95) TREFOUEL J., CHEYMDL J., PAUL R., PENAU M., HAGEMANN G., ROMAIN R.
ZIEGLER M., VIGNALOU J. et QUEVAUVILLER A. Etude physique,
chimique et pharmacodynamique des antibiotiques. IV- Bacitracine
Thérapie, 1956, 11, 961-93
- (96) WAISBREN B.A. and STRELITZER C.L. In vitro, activity and cross relationship
of antibiotics, with staphylococci and gram negative bacilli.
Antibiot.and Chemoth., 1960, 10, 545-55.
- (97) WARD J.R., MADOFF S. and DIENES L. In vitro, sensitivity of some
bacteria, their L forms and pleuropneumonia-like-organisms to
antibiotics. Proc.Soc.Exptl.Biol.Med., 1958, XB, 97, 132

- (98) WEIBULL C. The isolation of protoplasts of *Bacillus megatherium* by controlled treatment with lysozyme. *J.Bacteriol.*, 1963, 66, 688
- (99) WEINBERG E.D. The mutual effects of antimicrobial compounds and metallic cations. *Bacteriol. Rev.*, 1957, 21, 46-68
- (100) WEINBERG E.D. Enhancement of bacitracin by the metallic ions of Group IIB Antibiotics Annuals, 1958-59, *Med.Encycl.*, N-Y, 1959, pp. 924-29
- (101) WEINBERG E.D. Mechanism of action of antibacterial substances. *J.Soc.Cosmetic Chemists*, 1962, 13, 8996
- (102) WEINBERG E.D. Microbiological method for estimation of stability constants of bacitracin complexes of Zn, Cd and Mn. In *Antimicrobial Agents and Chemoth.*, 1964, 120. Ann Arbor (Mich) Amer.Soc.Microbiol, 1965
- (103) WEINBERG E.D. Antibacterial action of polyamine in presence of trace metals : enhancement by Cd. In *Antimicrobial Agents and Chemoth.* 1963, 573. Ann Arbor (Mich) Amer.Soc.Microbiol., 1964
- (104) WILLIAMS R.E.O. L forms of *Staphylococcus aureus*. *J.Gen.Microbiol.*, 1963, 33, 325
- (105) WISE E.H. and PARK J.T. Penicillin : its basic site of action as an inhibitor of a peptide cross linking reaction in cell wall mucopeptide synthesis. *Proc.Nat.Acad.Sci.U-S.*, 1965, 54, 75
- (106) WISSEMAN C.L., SMADEL J.E., HAHN F.E. and HOPPS E.H. Mode of action of chloramphenicol. I- Action of chloramphenicol on assimilation of ammonia and on synthesis of proteins and nucleic acids in *E.coli*. *J.Bacteriol.*, 1954, 67, 662-73
- (107) WONG D., BARBAN S. and AJL S. Inhibition of respiration by aureomycin and terramycin. *Antibiot.and Chemoth.*, 1953, 3, 607-12
- (108) ZINTEL M.A., MA R.A., NICHOLS A.C. and ELLIS M. The absorption, distribution, excretion and toxicity of bacitracin in man. *Am.J.Med.Sci.*, 1945, 113-439
- (109) ZORN R.A. Stabilization of Bacitracin. U.S.Patent, 1961, 2, 534-985

- (110) ZORN R.A., MALZAHN R.C. and HANSON A.M. Bacitracin. U.S. Patent 1959,2, 903, 337.
- (111) RYTER A. et JACOB F. Etudes au microscope électronique des relations entre mésosomes et noyaux chez *Bacillus subtilis*. C.R.Acad.Sci. Paris, 1963, 257, 3060, dans Précis de Microbiologie de LAMBIN S. et GERMAN A. Masson ed., 1969.

TABLE DES MATIERES

	Pages
<u>INTRODUCTION : DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	1
<u>TRAVAUX PERSONNELS</u>	15
A/ <u>DETERMINATION DE L'ACTIVITE BACTERIOSTATIQUE</u>	17
<u>Courbes de croissance</u> en présence de concentrations infra-bactériostatiques de bacitracine	21
B/ <u>DETERMINATION DE L'ACTIVITE BACTERICIDE</u>	28
1) <u>A l'égard de St.aureus</u>	
a) bactéries en phase de multiplication	30
b) bactéries quiescentes	30
c) influence du nombre de germes	32
2) <u>A l'égard d'E.coli</u>	34
a) bactéries en phase de multiplication	35
b) bactéries quiescentes	35
c) influence du nombre de germes	35
<u>Conclusion</u>	38
C/ <u>ACTION SUR LA PAROI BACTERIENNE</u>	42
I- <u>Etudes turbidimétriques</u>	
1) <u>Action des concentrations supra-bactérios-</u> <u>statiques sur des bactéries de 18 heures</u>	43
2) <u>Action des concentrations supra-bactérios-</u> <u>statiques sur des bactéries en phase</u> <u>exponentielle de multiplication</u>	45
3) <u>Rôle de l'âge des bactéries</u> dans l'induction de la lyse	47
<u>Conclusion</u>	49
II- <u>Formation de protoplastes bactériens</u>	51
1) <u>St.aureus</u>	52
2) <u>E.coli</u>	54

	<u>Pages</u>
D/ <u>ACTION SUR LA RESPIRATION BACTERIENNE</u>	59
1) <u>St.aureus</u>	62
a) Substrat = succinate ou pyruvate de sodium	63
b) Substrat = glucose	69
2) <u>E.coli</u>	
a) Substrat = succinate de sodium	69
b) Substrat = pyruvate de sodium	71
c) Substrat = glucose	71
<u>Conclusion</u>	81
E/ <u>ACTION SUR LES ACIDES NUCLEIQUES BACTERIENS</u>	83
I- <u>La technique</u>	83
1) <u>Protocole expérimental</u>	
a) Préparation des échantillons	84
b) Extraction des acides nucléiques	85
c) Dosage de l'A.D.N.	86
d) Dosage de l'A.R.N.	86
e) Lecture des résultats	87
2) <u>Critique de la technique</u>	
a) Non interférence de la bacitracine	87
b) Efficacité de l'extraction	88
c) Spécificité des dosages	89
II- <u>Les résultats</u>	
1) <u>Action sur les bactéries se multipliant</u>	
a) <u>St.aureus</u>	91
b) <u>E.coli</u>	93
2) <u>Etude cinétique</u> de la variation des acides nucléiques	95
a) <u>St.aureus</u>	96
b) <u>E.coli</u>	98
3) <u>Action sur les bactéries quiescentes</u>	100
<u>Conclusion</u>	102
<u>CONCLUSIONS</u>	105
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	118

=====

